



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Danilo da Silva Lopes**

**Importância das alterações cromossômicas na etiologia da  
infertilidade**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica

Orientadora: Prof<sup>a</sup>.Dra. Elaine Sbroggio de Oliveira Rodini

**Botucatu  
2015**

**Danilo da Silva Lopes**

**Importância das alterações cromossômicas na  
etiologia da infertilidade**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento:  
Biotecnologia Médica

Orientadora: Profa.Dra. Elaine Sbroggio de Oliveira Rodini

**Botucatu**

**2015**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Lopes, Danilo da Silva.

Importância das alterações cromossômicas na etiologia da infertilidade / Danilo da Silva Lopes. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Elaine Sbroggio de Oliveira Rodini  
Capes: 20205007

1. Infecundidade feminina. 2. Infecundidade masculina. 3. Aborto espontâneo. 4. Cariótipos. 5. Cromossomos humanos - Anomalias.

Palavras-chave: Abortos espontâneos; Alterações cromossômicas; Cariótipo; Infertilidade.

## Dedicatória

*À minha mãe **Romana Silva**, minha vida, pelo auxílio na formação do meu caráter, dedicação e exemplo. Pelo esforço para que eu consiga alcançar minhas metas e pelo amor incondicional. Simplesmente te amo.*

## **Agradecimentos**

A **Deus**, por ter me dado forças e me ouvido sempre que a Ele solicitei.

À **Profa. Dra. Elaine Sbroggio de Oliveira Rodini**, pelo auxílio na minha formação como profissional e pelas oportunidades acadêmicas oferecidas; pelos ensinamentos antes e durante o desenvolvimento do trabalho; pela paciência e confiança em mim depositadas.

Ao meu Pai **César Lopes**, pela confiança em mim depositada, pelo amor sempre demonstrado, amizade e apoio incondicional na vida.

Ao meu padrasto **João Cruz**, grande pai, pela sua disponibilidade em me ajudar sempre que precisei. Por me animar, me educar e encorajar na vida.

A todos os meus irmãos, em especial **Kevin, Kelisa e Dulce**, pelo companheirismo, amizade e apoio mútuo.

A toda à minha família, **Silva e Lopes**, primos e tios por estarem sempre presentes na minha vida e me apoiarem.

À **Maria Aparecida de Barros Agostinho**, pelos ensinamentos no Ambulatório e Laboratório de Genética da UNESP, Bauru e auxílio na minha formação profissional.

A todos os estagiários que faziam parte do Ambulatório e Laboratório de Genética da UNESP, Bauru, que de forma direta ou indireta me auxiliaram na realização deste trabalho, especialmente à **Nathália Martins Lopes**.

Ao **Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani**, pela sua colaboração na realização dos estudos estatísticos deste trabalho. Pela sua paciência e seus ensinamentos.

Aos funcionários do curso de **Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica)** e à coordenação, pelo auxílio e atendimento sempre quando necessitados.

*A todos os meus amigos que se encontram no Brasil e em cabo verde, por fazerem parte da minha família e me apoiarem durante todo esse período que aqui permaneci.*

*A todos aqueles aqui não citados que de forma direta ou indireta me auxiliaram no desenvolvimento do presente trabalho.*

## **Agradecimentos**

*Agradeço aos governos de Cabo Verde e do Brasil pela possibilidade do conhecimento adquirido. Em especial à UNESP, que através da instituição, dos docentes e funcionários, me deu a oportunidade de crescimento pessoal e profissional. Espero ter contribuído com este trabalho e acrescentado algo importante para a Ciência. Aplicarei, com a responsabilidade que me foi depositado, os conhecimentos que adquiri no Brasil, em minha terra natal, Cabo Verde.*

*"A felicidade só é real quando partilhada"*

**Christopher McCandless**



## Resumo

**Introdução:** A infertilidade é definida como a incapacidade de um casal obter uma gravidez ou parto de um bebê vivo. Ela não é exclusiva da mulher, mas sim do casal, e os fatores mais comuns associados são de origem genética, como alterações dos cromossomos, incluindo também causas hormonais, anatômicas, infecciosas, imunológicas, entre outras. A definição dos tipos de alterações cromossômicas presentes em um casal com dificuldades reprodutivas é de fundamental importância para sua vida reprodutiva. **Objetivo:** Verificar a importância das diferentes alterações cromossômicas na etiologia da infertilidade e discutir a indicação do cariótipo nos casos de dificuldades reprodutivas. **Metodologia:** Estudo retrospectivo de dados de 832 indivíduos, atendidos na Faculdade de Ciências/ UNESP, Bauru, no período de Janeiro de 2005 a Dezembro de 2012, referentes a estudos cromossômicos (cariótipo de sangue periférico e abortos espontâneos) e anamnese. **Resultados:** Dos 832 casos, 431 foram avaliados através dos cariótipos de sangue periférico e 514 através de seus cariótipos de abortos espontâneos; 113 foram avaliados tanto pelos cariótipos de sangue como pelos cariótipos de seus abortos. A frequência das alterações cromossômicas em sangue periférico foi de 5,6%, e de 32,5 % em abortos espontâneos. Não houve correlação estatística entre ocorrência das alterações cromossômicas, sexo, idade e número de abortos. **Conclusões:** Na população estudada observou-se que as alterações cromossômicas são importantes na etiologia da infertilidade. As alterações cromossômicas numéricas nos abortos são as mais frequentes; contudo, sua ocorrência pode ser maior devido a possível superestimação dos cariótipos normais pela contaminação de material materno. Para prevenção de malformações congênitas, ambos os membros do casal relacionados a problemas reprodutivos devem realizar o estudo cromossômico.

**Palavras-chave:** Infertilidade; Abortos espontâneos; Alterações cromossômicas; Cariótipo

## **Abstract**

**Introduction:** Infertility is defined as the inability of a couple of getting pregnant or give birth to a live baby. It is not only related to women, but also to the couple, and the most common factors associated are genetic, such as chromosome abnormalities as well as hormonal, anatomical, infectious and immunological causes, among others. The definition of the types of chromosomal abnormalities present in a couple with reproductive difficulties is of fundamental importance to their reproductive life.

**Objective:** To assess the importance of different chromosomal abnormalities in the etiology of infertility and discuss the indication of the karyotype in cases of reproductive difficulties. **Methodology:** Karyotypes of peripheral blood and miscarriages

(Chromosomal studies) and anamnesis of 832 individuals attended at the Faculdade de Ciências/ UNESP, Bauru, from January 2005 to December 2012 were assessed retrospectively. **Results:** Of the 832 cases, 431 were evaluated by peripheral blood

karyotypes and 514 through their karyotypes of miscarriages; 113 were evaluated both by karyotypes of both blood and abortions. The frequency of chromosomal abnormalities in peripheral blood was 5.6%, and 32.5% in spontaneous abortions.

There was no statistical correlation between occurrence of chromosomal abnormalities, sex, age and number of abortions. **Conclusions:** Chromosomal abnormalities are important in the etiology of infertility within the population studied.

The numerical chromosomal abnormalities in abortions were the most common; however, its occurrence may be higher due to possible overestimation of normal karyotypes by contamination of maternal material. Aiming the prevention of congenital malformations, both couple members presenting reproductive problems should perform a chromosome study.

**Key-words:** Infertility; Miscarriages; Chromosomal abnormalities; karyotype

## **Sumário**

<b>I.</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>11</b>
<b>II.</b>	<b>Revisão de literatura.....</b>	<b>14</b>
<b>II.1</b>	<b>Conceitos de infertilidade .....</b>	<b>15</b>
<b>II.2</b>	<b>Prevalência da Infertilidade .....</b>	<b>16</b>
<b>II.3</b>	<b>Etiologia não cromossômica .....</b>	<b>18</b>
<b>II.3.1</b>	<b>Causas Hormonais .....</b>	<b>19</b>
<b>II.3.2</b>	<b>Alterações anatômicas .....</b>	<b>20</b>
<b>II.3.3</b>	<b>Endometriose .....</b>	<b>22</b>
<b>II.3.4</b>	<b>Causas Imunológicas .....</b>	<b>23</b>
<b>II.3.5</b>	<b>Causas Infecciosas .....</b>	<b>24</b>
<b>II.3.6</b>	<b>Alterações espermáticas.....</b>	<b>25</b>
<b>II.3.7</b>	<b>Infertilidade e idade .....</b>	<b>25</b>
<b>II.3.8</b>	<b>Outras etiologias .....</b>	<b>26</b>
<b>II.4</b>	<b>Etiologia cromossômica .....</b>	<b>29</b>
<b>II.4.1</b>	<b>Aborto espontâneo .....</b>	<b>29</b>
<b>II.4.2</b>	<b>Causas cromossômicas e aborto espontâneo .....</b>	<b>31</b>
<b>II.4.3</b>	<b>Causas cromossômicas e infertilidade.....</b>	<b>33</b>
<b>III.</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>37</b>
<b>IV.</b>	<b>Metodologia.....</b>	<b>39</b>
<b>IV.1</b>	<b>Casuística e Métodos .....</b>	<b>40</b>
<b>IV.2</b>	<b>Métodos estatísticos .....</b>	<b>40</b>
<b>IV.3</b>	<b>Realização dos cariótipos .....</b>	<b>41</b>
<b>V.</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>43</b>
<b>VI.</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>57</b>
<b>VII.</b>	<b>Referências .....</b>	<b>60</b>

## Introdução

---

## I. Introdução

A infertilidade é definida como a incapacidade de um casal obter uma gravidez ou parto de um bebê vivo, após um ano de relações sexuais regulares sem o uso de métodos anticoncepcionais. Sua ocorrência eleva-se com a idade, sendo que um em cada quatro casais com mais de 35 anos terá dificuldades reprodutivas (ASRM, 2006; Thoma et al., 2013). É classificada como primária, quando não há antecedentes de gravidez no casal, ou secundária, quando existe antecedentes de gravidez em um ou outro membro do casal. Estima-se que a infertilidade acomete cerca de 1% a 26% dos casais em toda a sua vida reprodutiva. Essa prevalência vem aumentando no decorrer dos anos, elevando-se assim, o número de casais que tem procurado tratamentos em clínicas de reprodução assistida (Boivin et al., 2007; Mascarenhas et al., 2012-a).

Sabe-se hoje, que o problema da infertilidade não é exclusivo da mulher, mas sim, do casal, sendo que o homem é responsável por 30% das causas, e em 20% dos casos, ambos são responsáveis (Winston, 2013). Os principais fatores masculinos envolvem alterações na estrutura e funcionamento dos espermatozóides, obstrução ductal, sêmen anormal e ejaculação retrógrada; enquanto os femininos são decorrentes de desordens ovulatórias, anomalias tubárias, endometriose, anormalidades no muco e perturbações do trato genital (Thonneau et al., 1991; Lee et al., 2012).

A infertilidade pode se manifestar como ausência de gestações ou perdas fetais (abortos espontâneos), e os fatores mais comuns associados são de origem genética, como alterações nos cromossomos, incluem-se também, causas hormonais, anatômicas, infecciosas e imunológicas (Irvine, 1998; Nice, 2004).

As alterações cromossômicas podem ser estruturais e numéricas, e ocorrem em cerca 3% dos pacientes inférteis (Kayed et al., 2006). São responsáveis por cerca de 50% dos abortamentos espontâneos de 1º trimestre (Eiben et al., 1990).

Em casais com abortamento recorrente, as principais alterações observadas são as translocações recíprocas, translocações robertsonianas, polimorfismos, deleções e inversões, entre outras (Dutta et al., 2011).

Nos abortos espontâneos, é possível observar alterações cromossômicas numéricas em maior frequência do que as estruturais, sendo as trissomias mais prevalentes (Nagaishi et al., 2004). As alterações numéricas envolvem a poliploidia, quando o número cromossômico é múltiplo de  $n$ , caracterizando-se pela triploidia ( $3n$ ) e tetraploidia ( $4n$ ) e as aneuploidias quando há cromossomos ausentes ou adicionais. A causa mais comum está relacionada à não disjunção, uma falha na separação normal dos cromossomos durante a meiose, e consistem em monossomias e trissomias (Hassold & Hunt, 2001).

Quanto às alterações estruturais, encontram-se as translocações recíprocas que ocorrem quando há quebras em dois cromossomos diferentes e os segmentos são mutuamente trocados. Os cromossomos resultantes são chamados de cromossomos derivativos, e o portador é geralmente normal, pois tem um complemento normal de material genético. A prole, conseqüentemente pode ter a translocação, ser normal, ter duplicações ou deleções cromossômicas. Por outro lado, as translocações robertsonianas consistem na fusão centromérica dos braços longos de dois cromossomos não homólogos, e na perda dos braços curtos. Geralmente não causam alterações fenotípicas em seus portadores, contudo, apresentam alto risco para a prole, que pode apresentar um braço longo extra ou ausente (Gardner et al., 2004).

As alterações nos cromossomos sexuais são as principais causas de problemas reprodutivos. Envolvem as anomalias numéricas, como a trissomia e a monossomia do X ( $47,XXX$  e  $45,X$ ), ou X e Y adicionais ( $47,XXY$  e  $47,XYY$ ); e as anomalias estruturais, que podem ser equilibradas e não equilibradas. Os portadores podem ser assintomáticos, quando a alteração é equilibrada, e os fenótipos são normais, contudo estão associadas a alterações reprodutivas devido a problemas na produção dos gametas (Rajangan & Nanjappa, 2007; Kosar et al., 2010).

Sendo assim, a etiologia da infertilidade é heterogênea e complexa, envolvendo diversos fatores. Em muitos casos, pode ser esclarecida e tratada; em outros, o casal terá que procurar métodos de reprodução assistida e por vezes, o diagnóstico pré-implantacional. A definição da alteração cromossômica do casal, quando houver, é de fundamental importância para sua vida reprodutiva e prevenção de malformações congênitas em conceptos.

**Revisão de literatura**

---

## **II. Revisão de literatura**

### **II.1 Conceitos de Infertilidade**

A Infertilidade é um problema do sistema reprodutivo definida pela incapacidade de alcançar uma gravidez clínica após 12 meses, ou mais, de relações sexuais desprotegidas (Thoma et al., 2013). Outros autores ampliam esse tempo para dois anos (Nice, 2004).

A sociedade Americana de Medicina Reprodutiva conceitua a infertilidade como sendo uma condição caracterizada pela falha em obter uma gravidez bem sucedida após 12 meses ou mais de relação sexual regular e desprotegida, ou em tratamento por inseminação artificial. Pode-se considerar após 6 meses, com base na história clínica do paciente ou devido a idade acima de 35 anos (ASRM, 2013)

Diferente dessas definições clínicas, as definições demográficas da infertilidade possuem um conceito diferente, relacionado ao tempo para concepção. Estimam a infertilidade geralmente em mulheres, e com um tempo para concepção de cerca de 5 anos (Larsen, 2005).

Larsen (2003) em seu estudo demográfico, define a infertilidade como ausência de filhos em mulheres casadas após cinco anos de tentativas, tendo já registrado algum nascimento ou não. Liu et al. (2005), por outro lado, usaram como definição a ausência de alguma gravidez após sete anos de casamento.

A grande repercussão entre essas definições ocorre pelo fato de que, na prática clínica, o intuito é sempre diagnosticar o problema o mais cedo possível e dar início ao seu tratamento para melhorar as chances de concepção. Por outro lado, a definição demográfica é menos errônea, pelo fato de avaliar de forma mais específica e completa, grandes populações (Gurunath et al., 2011; Larsen, 2005).

A infertilidade pode ser classificada em primária e secundária. A primária é definida por vários autores como a incapacidade de concepção em casais que nunca tiveram filhos, após um a dois anos de relações sexuais sem métodos contraceptivos. Por outro lado a secundária é definida como uma incapacidade de concepção em



casais que já possuem histórico de concepção e nascimento (WHO, 1991; Nice, 2004).

Autores que seguem a linha demográfica defendem que a infertilidade primária deve ser definida e medida em mulheres casadas que não conseguem ter filhos após sete anos de casamento, tendo relações sexuais desprotegidas e regulares. A secundária, no caso, seria a ausência de nascimentos em mulheres casadas, com pelo menos um filho, e que foram expostas a tentativas regulares de ter filhos logo após o nascimento do último, por pelo menos cinco anos (Larsen, 2000; Liu et al., 2005; Mascarenhas et al. 2012-a)

Alguns autores definem de forma errônea, a esterilidade, ao confundi-la, com a infertilidade. Porém para alguns, como Habbema et al. (2004), a esterilidade se define quando a possibilidade de conseguir uma concepção é estimada como impossível, havendo uma inabilidade irreversível.

Em relação ao termo infertilidade, se inclui tanto a subfertilidade e a esterilidade absoluta. Tudo isso leva de uma forma biológica, que a capacidade de produzir a prole seja diminuída, e estatisticamente observa-se uma relevante redução no número real de descendentes produzidos (Chandley, 1979).

## **II.2 Prevalência da infertilidade**

Para definir a prevalência de infertilidade, alguns autores usam a definição demográfica, outros, a clínica. Porém, uma grande parte adota a definição demográfica da infertilidade, pelo fato de considerar grandes populações. A prevalência em uma população pode trazer importantes implicações, pelo fato de que uma alta infertilidade tem um efeito amortecedor sobre a fertilidade global e na taxa de crescimento da população (Rutstein & Shah, 2004; Larsen, 2005).

As prevalências de infertilidade primária e secundária, podem ser calculadas através do número de mulheres inférteis que se encontram em um relacionamento, dividido pelo número de mulheres férteis e inférteis que se encontram em um relacionamento (Mascarenhas et al., 2012-b).

Segundo Thoma et al. (2013), a prevalência da infertilidade nos USA em mulheres de 15 a 44 anos, é de 15,5% e 7% considerando dois diferentes métodos de avaliação. O primeiro método consistiu da avaliação de mulheres que não usavam nenhum método contraceptivo e tinham relações sexuais frequentes, e o segundo método, em mulheres que se encontravam em um relacionamento, com uso ou não de contraceptivo.

Em um estudo feito por Boivin et al. (2007), foram avaliadas as prevalências de vários estudos de regiões diferentes para estimar uma prevalência global. Analisaram 28 trabalhos feitos tanto em países desenvolvidos como aqueles em desenvolvimento, com diferentes definições de infertilidade, e observaram uma prevalência que variava de 6,6% a 26,4% em países desenvolvidos e de 1,3% a 25,7% em países em desenvolvimento.

Mascarenhas et al. (2012-b) avaliaram a prevalência em 277 estudos de 190 países diferentes, durante o período de 1990 a 2010 e observou que o número de casais afetados pela infertilidade vem aumentando de 42,0 milhões em 1990 para 48,5 milhões em 2010. Segundo o estudo, mulheres na idade reprodutivas e expostas por pelo menos cinco anos à tentativa de reproduzir, 1,9% não alcançaram pelo menos uma gravidez e 10,5% não alcançaram a gravidez após ter tido pelo menos um parto.

Rutstein & Shah (2004) mostraram um estudo comparativo da prevalência da infertilidade de diversas regiões em três continentes. No continente africano a prevalência é de 2,6% em mulheres com infertilidade primária e 28, 2% secundária. Na Ásia, 2,6% com infertilidade primária e 26,4% secundária; por fim nas Américas a prevalência é de 2,2% para a primária e 20,2% secundária. Esse estudo, assim como outros mostra a alta prevalência de infertilidade secundária em relação a primária.

No Brasil, em mulheres de 20 a 49 anos, a infertilidade é estimada entre 1,5% e 1,6% para a primária e de 12,4% e 16,7% para a secundária (Mascarenhas et al., 2012-b). Rutstein & Shah (2004) avaliando a prevalência de infertilidade no Brasil, sem distinção entre a primária e a secundária, mostraram que a incidência em estudos feitos com mulheres de idade compreendida entre 15 a 49 anos é de 10,4%, e de 12,6% em estudos com idade entre 25 a 49 anos.

## **II.3 Etiologias não cromossômicas**

A infertilidade pode ter causas tanto femininas quanto masculinas. Segundo Winston (2013), a prevalência é estimada em 50% de fatores femininos, 30% masculinos, 20% ambos e fatores desconhecidos, enquanto outros como Cardona (2012) mostram uma prevalência de 44,3% de fatores masculinos, 28% ambos, 20,5% femininos e 7,2% desconhecidos.

Entre as causas femininas, segundo Hull et al. (1985), os principais problemas são falhas ovulatórias (amenorreia e oligomenorréia), alterações tubárias e endometriose. Quanto aos masculinos, citam azoospermia e oligospermia. Outras anomalias como alteração do muco cervical e falhas na tentativa de coito também foram relatadas.

É possível constatar que a etiologia da infertilidade varia de acordo com a complexidade do estudo feito, das avaliações e tipos de exames realizados em cada estudo. Alguns autores mais recentes referem causas masculinas como desordens no sistema endócrino, fatores infecciosos, imunológicos, obstrução do canal ejaculador, varicocele e causas genéticas. Por outro lado as femininas envolvem disfunção ovulatória, anormalidades das trompas e do útero, fatores endócrinos, imunológicos e infecciosos e causas genéticas (Unuane et al., 2011; Passos et al., 2007; Lee, et al. 2012).

Avaliaram populações de três regiões da França, e estimaram a prevalência em um total de 1.850.000 indivíduos. Observaram causas femininas como desordens ovulatórias (32%), anormalidades nas trompas (26%), endometriose (4%), hiperprolactinemia (4%), anormalidades no muco (4%) e perturbações do trato genital (4%). Enquanto as masculinas envolveram oligospermia (21%), astenozoospermia (17%), teratozoospermia (10%) e azoospermia (9%) (Thonneau et al., 1991).

Esses conjuntos de estudos que relatam as etiologias da infertilidade mostram em seu todo, uma quantidade de patologias e alterações que afetam a qualidade e o funcionamento dos gametas, afetando assim a fertilidade do casal ou o surgimento de uma gestação anormal.

### **II.3.1 Causas Hormonais**

Em relação à função reprodutiva, é importante que esteja intacto o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal para um bom funcionamento endócrino. A regulação deste eixo é feita por dois principais hormônios, o luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante (FSH) (Aittomakiet al., 1995; Greenstein & Wood, 2011).

Sabendo-se que o testículo é responsável pela produção de espermatozóides e secreção de testosterona, necessária para o desenvolvimento das características sexuais secundárias e manutenção da espermatogênese, é de extrema importância o bom funcionamento do eixo, pois, essas funções dependem desses hormônios produzidos na hipófise gonadotrófica, que estimulam os testículos a produzirem testosterona (o hormônio LH), e na espermatogênese (o FSH) (Greenstein & Wood, 2011).

Em mulheres, o bom funcionamento do eixo é de extrema importância para manter uma boa ovulação, estimulada pelos hormônios LH e FSH. Alterações nesses hormônios podem levar à ausência ou a alterações da ovulação (Passos et al., 2007; Mohan & Sultana, 2010).

Geidam et al. (2008), avaliando o perfil hormonal e a prevalência de alterações endocrinológicas em homens que estavam sendo investigados devido à infertilidade, observaram que 66,7% deles possuíam nível elevado de FSH, 50% baixo nível de testosterona e 12,5%, alto nível de prolactina sérica. Também observou uma prevalência de 41,7% de pacientes com hipergonadismo hipergonadotrófico e 4,2% com hipogonadismo hipogonadotrófico. Segundo o autor, esses valores mostram-se significativamente maiores do que em uma população normal, assim, uma avaliação hormonal deve ser sempre indicada principalmente em pacientes que possuem um baixo número na contagem dos espermatozoides.

Mohan & Sultana (2010) estudaram os níveis hormonais em um grupo de mulheres inférteis e em um grupo controle. Observaram um baixo nível dos hormônios FSH e LH em mulheres inférteis comparado com o controle, e um alto nível de prolactina. Como o LH e o FSH são responsáveis pelo desenvolvimento folicular, um baixo nível desses causado pela elevação do nível de prolactina, pode levar à infertilidade.

Aittomakiet al. (1995) ao avaliarem causas de falência ovariana, observaram que certas mutações no gene do receptor do hormônio folículo-estimulante (FSHR), podem ocasionar falência ovariana hipergonatrófica (OGD) hereditária.

A Síndrome do Ovário Policístico (SOP) é uma das principais desordens endócrinas em mulheres, e está associada à infertilidade. Ela é caracterizada por um conjunto de alterações, como a amenorréia, oligomenoréia, hiperandrogenemia e policistos no ovário (Ehrmann, 2005; Azziz et al., 2006).

### **II.3.2 Alterações Anatômicas**

Tendo em vista que a causa da infertilidade é multifatorial, deve-se observar correlações entre as alterações anatômicas e problemas de fertilidade. Na mulher, alterações tubárias e uterinas estão geralmente associadas à infertilidade, enquanto nos homens varicocele, falta de ejaculação e ejaculação retrógrada, entre outros, podem causar a infertilidade (Nice, 2004; Perez et al., 2001).

As alterações tubárias afetam cerca de 14% de mulheres inférteis, e essas alterações incluem tanto a obstrução tubária como aderências pélvicas. Elas podem estar associadas à doença inflamatória pélvica, cirurgias anteriores, endometriose e infecções (Hull et al., 1985).

As alterações uterinas podem ser encontradas em cerca de 16% da população infértil, estando associadas principalmente a pólipos, fibromas e aderências. Os pólipos são geralmente mais prevalentes, (13%), os fibromas e as aderências, menos frequentes, (2,8% e 0,3 % respectivamente) (Kaspa et al., 2006).

Nos homens, a ultrassonografia escrotal é importante para avaliação de problemas anatômicos que possam estar ligados à infertilidade. Com o exame é possível diagnosticar alterações tais como, epididimite, torção escrotal, varicocele, câncer, microlitíase, entre outras alterações que possam estar ligadas a azoospermia obstrutiva (Pierick et al., 1999; Moon et al., 2006 ).

Pierick et al. (1999) observou que em homens inférteis, as alterações escrotais eram prevalentes em 38%, sendo 0,5% tumores, 0,7% microlitíase, 3,2% hidrocele, 7,6% epididimite e 29,7% varicocele.

Em relação à azoospermia obstrutiva, alterações tanto na cabeça, corpo e cauda do epidídimo, podem ser observadas e estão significativamente ligadas à etiologia da infertilidade. Moon2006. Assim, cirurgias de correção do bloqueio são importantes para restauração do ducto e da fertilidade, e uma alternativa, em certos casos à fertilização in vitro (Nice, 2004).

Falhas na ejaculação como a anejaculação e a ejaculação retrógrada estão também associadas a alterações anatômicas. Essas podem ser adquiridas de cirurgias como a do colo da bexiga e prostatectomia, ou congênitas, como estenose uretral, válvula uretral posterior e alterações nos ductos ejaculatórios. Tratamentos específicos para essas alterações podem recuperar a fertilidade sem necessitar de métodos mais invasivos (Kamischke et al., 1999; Nice, 2004).

Entre as alterações anatômicas, deve-se ter uma especial atenção com a varicocele, pois nos homens ela tem sido relatada como uma das mais prevalentes alterações encontradas em pacientes inférteis. Conhecida como uma dilatação anormal das veias do plexo pompiniforme testicular, autores relatam a sua prevalência em cerca de 35% em homens com infertilidade primária e 81% com a secundária, enquanto outros, a mostram como a mais frequente das alterações escrotais encontradas no homem infértil (Gorelick & Goldstein, 1993; Pierick et al., 1999).

### **II.3.3 Endometriose**

A endometriose é definida como a presença de tecido endometrial, glândulas e estroma, fora do útero, levando a uma reação inflamatória crônica. Ocorre principalmente em mulheres na idade reprodutiva, e seus sintomas tem grande impacto no bem estar físico mental e social da mulher (Harrison et al., 2000; Kennedy et al., 2005).

A endometriose é classificada de acordo com a sua gravidade, em quatro estados: mínimo, suave, moderado e severo. É possível observar que ela se expressa como dismenorréia, dispareunia, dor crônica pélvica e infertilidade, tendo um grande numero de pacientes que se apresentam assintomáticas (Kennedy et al., 2005; Haas et al., 2012).

A verdadeira prevalência da endometriose tem se mantido incerta ao longo dos anos, porém, vários autores mostram a sua correlação com a infertilidade. Para alguns autores a prevalência é de 60.7% enquanto outros ele varia de 30% a 50 % (Inoue et al., 1992; D'Hooghe et al., 2003).

Meuleman et al. (2009) avaliando a prevalência de endometriose em mulheres inférteis, observaram que 47% delas possuíam endometriose, em diferentes estágios e que a prevalência era maior em pacientes que já possuíam dor pélvica (54%) em relação às que não possuíam (40%).

A fecundidade é menor em mulheres com endometriose, em relação às normais (Hughes et al., 2010). Sabe-se que ela afeta a fertilidade através da distorção da anatomia pélvica, alteração da função peritoneal e do fluido folicular, transporte uterotubal anormal, alteração hormonal, anormalidades ovulatórias (devido à alteração na foliculogenese), má implantação do embrião e qualidade do ovócito e do embrião (ASRM, 2012-b; Gupta et al., 2008).

A influência da endometriose na infertilidade pode ser mostrada no estudo de Pelicer et al. (2001), no qual foi relatada a influência na qualidade do ovócito. Em um programa de doação de ovócitos, foi observado que, aqueles doados por pacientes sem endometriose, possuíam uma taxa de desenvolvimento e implantação semelhante em pacientes com e sem endometriose, porém aqueles recebidos de pacientes com endometriose mostraram de forma significativa uma diminuição no desenvolvimento e implantação.

Pacientes inférteis com a endometriose geralmente são submetidos a tratamentos para melhorar a sua fertilidade, como os cirúrgicos, hormonais e inseminações intrauterinas ( ASRM, 2012-a; Kennedy et al., 2005).

### **II.3.4 Causa imunológicas**

Os anticorpos antiespermáticos, segundo literatura, mostram correlações com a infertilidade. São caracterizados por uma resposta imunológica ao antígeno do espermatozóide e podem ser encontrados tanto no homem como na mulher, conduzindo a um quadro de infertilidade do casal (Kamienicznaabdef et al., 2003; Hadinedoushan et al., 2006).

Segundo o estudo de Kamienicznaabdef et al. (2003), os anticorpos antiespermáticos são mais prevalentes nos homens do que as mulheres. A prevalência é de 7% nos homens inférteis e 4,1% nas mulheres, tendo ainda uma prevalência de 3,2% quando é avaliado no soro das mulheres. Em espermatozóides dos homens inférteis, a prevalência de anticorpos varia de 8 a 10,4%(Kamienicznaabdef et al., 2003; Hadinedoushan et al., 2006).

Esses anticorpos estão ligados a um quadro de infertilidade pelo fato de estarem associados a alterações na estrutura e funcionamento dos espermatozóides (Bohring & Krause, 2003). Altos níveis do anticorpo são encontrados em homens com obstrução do ducto genital, testiculite e varicocele (Navi et al., 2012).

Uma outra associação entre a infertilidade e alterações imunológicas são observadas em mulheres com falência ovariana prematura, doença do ovário policístico, endometriose e infertilidade idiopática (Forges et al., 2004). A autoimunidade tireoidiana também associa-se à etiologia da infertilidade, e é mais prevalente em mulheres inférteis comparada com as normais (Poppe et al. 2002, 2008).

### **II.3.5 Causas infecciosas**

A infertilidade, segundo vários autores, possui correlação com certas doenças infecciosas. Etiologia essa, geralmente associada a doenças sexualmente transmissíveis, afeta a infertilidade por meio de patologias virais e bacterianas, sendo observada uma grande prevalência das bacterianas perante a literatura (Ochsendorf, 2008 Malik et al.,2009).



Em mulheres, a literatura mostra uma intensa correlação entre a infertilidade e infecções causadas por *Chlamydia trachomatis*. Esta, é encontrada em maior prevalência em pacientes inférteis, e atinge principalmente mulheres com infertilidade secundária. Ela atinge tanto mulheres inférteis que não apresentam nenhum sintoma, como também se expressa afetando o trato genital feminino e outras estruturas reprodutoras (Malik et al., 2009; Haggerty et al., 2010).

Observa-se que outras infecções bacterianas, como a *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Neisseria gonorrhoeae* são associadas a infertilidade. Observa-se alta prevalência em mulheres com a doença inflamatória pélvica e endometriose (Haggerty et al., 2004; Imudia et al., 2008; Short et al., 2009).

Assim como nas mulheres, os homens inférteis apresentam uma grande prevalência de infecções bacterianas. Destas, a *Chlamydia trachomatis* é a mais prevalente, sendo possível observar outros tipos também. Ela atinge o trato genital masculino afetando de forma significativa a qualidade seminal, acometendo o volume, a concentração, motilidade e morfologia espermática (Cunningham et al., 2008; Korpela et al., 2009).

As infecções causadas por vírus são observadas, também, como fator etiológico em casais inférteis. Encontra-se na literatura correlação maior das infecções virais e a infertilidade no homem, como por exemplo, HPV, herpes, HIV, citomegalovírus e vírus da hepatite (Ross et al., 2003; Bezold et al., 2007; Perino et al., 2011).

### **II.3.6 Alterações espermáticas**

De acordo com a ASRM, (2012-b), para a avaliação da infertilidade, a análise do sêmen é um dos passos iniciais e um dos mais importantes para esclarecimento da etiologia.

Para a avaliação de alterações no sêmen como uma provável causa da infertilidade, é de extrema importância a observação do volume, a morfologia,

concentração e motilidade dos espermatozóides (WHO, 2010). A fertilidade é prejudicada por alterações como volume baixo do sêmen, (hipospermia), volume alto (hiperespermia); alterações na concentração espermática, oligospermia (quando a concentração é baixa) polizoospermia (quando concentração é alta) e azospermia (quando nenhum espermatozóide é ejaculado); alterações na morfologia do espermatozoide (envolvendo a estrutura da cabeça, incluindo o acróssoma, na peça intermediária e na cauda) levando a um quadro de teratospermia; alterações na motilidade, resultando em espermatozóides lentos ou imóveis (astenospermia) (WHO, 2010; Cavalcante et al. 2003; Cooper et al., 2009).

Guzick et al. (2001) avaliaram a morfologia, a motilidade e a concentração dos espermatozóides em pacientes inférteis, comparando com pacientes férteis. Observaram que os pacientes inférteis possuíam uma concentração de espermatozóides menor do que os férteis.

### **II.3.7 Infertilidade e Idade**

Grande parte dos casais nos dias atuais, começam a tentar engravidar em idades mais avançadas. Isso devido ao aumento do nível de educação, planejamento de carreira e vida pessoal. Assim, a incidência de problemas reprodutivos é maior em idades avançadas, levando ao aumento de casais que procuram assistência para a reprodução (ASRM, 2006).

Em um estudo que avaliou 5860 ciclos menstruais de 782 casais, foi possível observar que a fertilidade nas mulheres, começa a ter um declínio a partir dos 20 anos de idade. A probabilidade de engravidar é duas vezes maior em mulheres com idade entre 19 e 26 anos, em comparação com a de 35 a 39 anos. Por outro lado, a fertilidade dos homens começa a declinar de forma significativa a partir dos 30 anos (Dunson et al., 2002).

Dunson et al. (2002) observaram que a prevalência de infertilidade é estimada em 8% em mulheres na faixa etária de 19 a 26 anos, 13 a 14% na de 27 a 34 e 18% na de 35 a 39 anos, mostrando um aumento significativo da infertilidade à medida que a faixa etária se eleva.

Ao avaliar a prevalência da infertilidade de acordo com a idade, Mascarenhas et al. (2012-a;b) observaram que a infertilidade primária possui uma alta prevalência em idades mais precoces, enquanto a secundária é mais prevalente em idades avançadas. As duas prevalências foram avaliadas em três tempos diferentes de tentativa de concepção, tendo observado o mesmo resultado.

Devido a um não consenso específico de qual idade pode ser considerada avançada, a American society for reproductive medicine recomenda considerar a partir dos 35 anos de idade. Mulheres com 35 anos de idade devem, o mais cedo possível, ser investigadas em relação a problemas de infertilidade e possivelmente tratadas (ASRM, 2006).

### **II.3.8 Outras etiologias**

#### **Obesidade**

A obesidade ao longo dos tempos vem sendo associada à alterações da fertilidade em ambos os sexos. Na mulher ela pode interferir em muitos processos endócrinos, refletindo na ovulação e fertilidade. Por outro lado, no homem, pode interferir nas funções sexuais, endócrinas, temperatura escrotal e nas características seminais (Pasquali et al., 2003; Hammound et al., 2008).

A correlação entre obesidade e aborto espontâneo, foi avaliada por Lashen et al. (2004), que relataram que o risco de aborto no primeiro trimestre de gestação, bem como de abortos recorrentes, era significativamente maior em pacientes obesos. Bellver et al. (2003) observaram também, a obesidade como um fator de risco relevante para o aborto espontâneo em pacientes que tinham recebido oócito, através de fertilização in vitro, quando comparadas às não obesas.

Cheng et al. (2007) observaram em estudo com 1506 homens, que a obesidade possui uma grande correlação com a disfunção erétil, podendo estar ligada a problemas hormonais. Em relação às desordens espermáticas, é possível ver significantes relatos na literatura que mostram correlações entre a obesidade e

alterações na concentração e mobilidade espermáticas, na morfologia e integridade da cromatina do espermatozóide (Hammound et al. 2008; Plessis et al., 2010).

Segundo a Nice (2004), mulheres e homens obesos devem sempre ser informados sobre a sua baixa taxa de concepção e fertilidade, e que as mulheres que planejam submeter-se à reprodução assistida, a perda de peso é essencial, pois para o sucesso do procedimento, o índice de massa corporal ideal é 19 a 30 kg/m<sup>2</sup>.

## **Câncer**

A correlação entre a infertilidade e o câncer vem sendo relatada por diversos autores. Se por um lado, temos a incidência de diversos tipos de cânceres com etiologia relacionada a problemática da infertilidade e ao tratamento dela, por outro, temos a incidência da infertilidade em pacientes tratados de câncer (Cetin et al., 2008; Dohle, 2010).

A quimioterapia e a radioterapia continuam a ser os principais tratamentos do câncer. Essas opções terapêuticas possuem um impacto enorme na saúde e capacidade reprodutiva, pelo fato de serem tóxicos às gônadas, levando a um quadro de infertilidade. Os efeitos das radiações nas gônadas podem levar também, a consequências mais leves, como diminuição da contagem espermática e perda acelerada de folículos, como mais severas, a um quadro de esterilidade (Woodruff et al., 2007).

Ness et al. (2002) mostraram em estudo de caso-controle, a associação entre a infertilidade e o câncer do ovário. Raman et al. (2005), mostraram uma grande incidência de câncer testicular em pacientes inférteis e com anormalidades espermáticas, alertando que o câncer do testículo pode ser uma possível causa da infertilidade.

Cetin et al., (2008), analisaram associações feitas na literatura entre o câncer e a infertilidade, e encontraram prevalentes trabalhos que associavam o câncer do ovário, da mama, do endométrio à infertilidade, em mulheres. No estudo, observaram também, correlações existentes entre a indução da ovulação no tratamento da infertilidade e o risco de câncer.

## **Ambiente e estilo de vida**

O ambiente em que a pessoa se encontra e seu estilo de vida estão diretamente ligadas à sua saúde. Alterações no ambiente como, excesso de exposição a agentes patogênicos e à utilização de álcool, drogas e outros produtos químicos, estão frequentemente relatados por diversos autores, como causa da infertilidade (Garcia et al., 2005; Mendiola et al., 2009; Anderson et al., 2010).

Akinloye et al. (2006), avaliaram a toxicidade da exposição ao cádmio e mostrou correlação com a infertilidade, devido ao seu efeito na espermatogênese. Por outro lado, Garcia et al. (2005), relataram associação entre exposições a diversos ambientes profissionais e observaram uma possível correlação entre radiações e infertilidade.

O estilo de vida e a sua relação com a infertilidade, envolve a dieta, devido à carência de certas vitaminas que afetam a fertilidade; obesidade como já foi anteriormente abordado; habito de fumar; uso de álcool, drogas ilícitas e medicamentos prescritos (Mendiola et al., 2009; Anderson et al., 2010).

### **Psicológicas**

Em estudos como o do Chen et al. (2004) é possível observar que em mulheres inférteis, em processo de reprodução assistida, 40,2% apresentavam algum problema psicológico, entre eles os mais frequentes envolviam ansiedade e depressão. Fassino et al. (2002), mostrou que é possível observar a existência de correlações entre psicopatologias e indivíduos inférteis funcionais.

Segundo a Nice, (2004) é importante, em casais inférteis, o acompanhamento e aconselhamento psicológicos, para prevenir o aparecimento de psicopatologias que podem complicar o tratamento e terapêutica, principalmente da reprodução assistida.

## **II.4 Etiologia Cromossômica**

A etiologia cromossômica de problemas relacionados a fertilidade, se refere a alterações cromossômicas numéricas ou estruturais presentes no casal ou em seus produtos gestacionais, como o aborto espontâneo.

### **II.4.1 Aborto espontâneo**

Aborto espontâneo é referido como perda de uma gravidez, até a vigésima semana de gestação, sem o uso de métodos ou intervenções que induzem ao aborto (Wang et al., 2001, 2004; Griebel et al., 2005).

O aborto denomina-se recorrente ou habitual, quando ocorrem três ou mais perdas gestacionais consecutivas, porém o diagnóstico pode ser feito, também, a partir de duas perdas fetais.(Griebel et al., 2005; ASRM, 2013)

A prevalência de abortos espontâneos em gestações identificadas clinicamente é controversa. Por um lado alguns autores referem a prevalências entre 6 a 21% (Hamamah et al., 1997), outros entre 15 e 20 %. Essas diferenças estão ligadas a diferentes populações estudadas, mas principalmente a diferentes metodologias de identificar as gestações. (Wang et al., 2004; Friebe & Arck, 2008).

Wilcox et al., (1988), realizou um estudo de prevalência de abortos espontâneos, com uma especificidade e sensibilidade maior do que os outros estudos. Avaliaram os níveis de gonadotrofina coriônica humana (hCG) na urina de 221 mulheres e observaram que a prevalência de interrupção de gestações era de 31%, maior do que o observado em outros trabalhos que consideram gravidez detectada clinicamente.

O aborto espontâneo recorrente possui uma incidência menor na população geral, sendo relatado entre 1 a 5% entre todos os casais que tentam conceber (Rai & Regan, 2006). Estudos mostram que a recorrência do aborto aumenta significativamente após o primeiro aborto, e gradualmente, após cada aborto seguinte (Regan et al., 1989; Maconochie et al., 2006).

As principais causas do aborto espontâneo estão relacionadas principalmente a alterações genéticas, tanto cromossômicas como gênicas. Fazem também parte da etiologia, alterações imunológicas, infecciosas, endócrinas, anatômicas e psicológicas (Pandey et al., 2005; Rai & Regan, 2006; Toth et al., 2010).

As alterações anatômicas relacionadas ao aborto, são aquelas que alteram o funcionamento uterino, como aderências intrauterinas, fibroides uterinos, sinéquias

uterinas, endometriose e úteros didelfos, bicornos e septados (Li et al., 2002- Toth et al., 2010).

Infecções que afetam o feto, a placenta e a vilosidade coriônica são apontadas como causas do aborto espontâneo em 4% dos casos. O citomegalovírus, assim como o vírus da herpes estão relacionados respectivamente, com infecções na placenta e no trato genital; porém as infecções bacterianas são consideradas mais relevantes. Infecções pela *Chlamydia trachomatis* no trato genital e cervico-vaginal podem levar a um quadro de aborto espontâneo por repetição (Ralph et al., 1999; Nigro et al., 2011).

Observa-se que as disfunções endócrinas como autoimunidade da tireóide, diabetes e hiperprolactinemia estão relacionadas com aborto espontâneo, porém, a síndrome do ovário policístico (SOP) é a mais prevalente. Ela é um problema relacionado à hiperandrogenismo ovariano, provavelmente resultante de uma anormalidade primária do biossíntese de andrógeno, e é encontrada em uma frequência de 40% em pacientes com aborto recorrente (Homburg, 1996; Rai & Regan, 2006).

Para a formação da unidade feto-placentária é necessária uma boa resposta imunológica, ao processo de implantação. O aborto espontâneo resulta de uma resposta imunológica humoral e celular em relação ao embrião (Toth et al., 2010). Os fatores imunológicos mais comumente relacionadas com o aborto são os aloimunes e os autoimunes, sendo os últimos mais prevalentes (Caetano et al., 2006).

Apesar de o aborto espontâneo acometer a mulher, o fator masculino é geralmente associado. Alterações espermáticas estão listadas como as principais causas, sendo observados problemas tanto na constituição cromossômica do espermatozóide, na qualidade, estrutura da cromatina e na quantidade, relacionados ao quadro de aborto ( Hamamah et al., 1997 ;Pandey et al., 2005; Kennedy et al., 2010).

Outras causas externas como o uso do álcool, o uso excessivo de cafeína, do cigarro, drogas ilícitas, grupos de medicamentos e a exposição a certas toxinas são relacionadas, ao longo da literatura, como fatores do aborto espontâneo (Griebel, 2005).

## **II.4.2 Alterações cromossômicas e o aborto espontâneo**

As alterações cromossômicas atingem casais com problemas reprodutivos em geral, incluindo os que apresentam abortos espontâneos. Elas são as principais causas da ocorrência do aborto espontâneo, estando presentes em cerca de 50% daqueles de primeiro trimestre (Eiben et al., 1990; Carp et al., 2001- Griebel, 2005; Rai & Regan, 2006).

Nos cariótipos realizados em materiais de aborto espontâneo, é possível observar prevalência maior de alterações numéricas (94,2%) em relação às estruturais (4,7%) (Eiben et al., 1990; Nagaishi et al., 2004; Ljunger et al., 2005).

Nagaishi et al. (2004) relataram que entre as alterações cromossômicas observadas em materiais de aborto espontâneo, as trissomias eram as mais prevalentes (61,2%), seguido das triploidias, monossomia do X, tetraploidias e rearranjos estruturais balanceados e não balanceados. Eiben et al., (1990) e Ljunger et al., (2005) relataram valores similares, seguindo a escala decrescente de frequências de trissomias, poliploidias e monossomia do X. Nos estudos, foi possível observar que as maiores incidências de trissomias eram as do cromossomo 16, 21 e 22.

As alterações cromossômicas estruturais, observadas nos abortos espontâneos são as menos prevalentes. Incidem em cerca de 5 % sobre as alterações encontradas (Nagaishi et al., 2004; Shearer et al., 2011). Pode-se encontrar tanto as equilibradas como as alterações não equilibradas, sendo a primeira mais prevalente (66%) em relação a segunda (34%) (Shearer et al., 2011).

Eiben et al., (1990) mostraram que a incidência de abortos com alteração numérica aumentava significativamente com a idade, porém isso não acontecia com as alterações estruturais.

Em casais com alterações cromossômicas, o aborto habitual pode estar associado tanto a fatores masculinos como femininos, e a prevalência varia entre de



3 e 7 % de acordo com a população estudada. Nessa situação as alterações estruturais são mais prevalentes (Celep et al., 2005; Dutta et al., 2010).

As alterações cromossômicas, observadas em casais com abortamento habitual, envolvem translocações recíprocas, translocações robertsonianas, mosaicismos de cromossomos sexuais, alterações polimórficas, inversões entre outras mais esporádicas (Kiss *et al.*, 2009; Celep et al., 2005; Dutta et al., 2010).

As alterações estruturais, em casais com aborto recorrente, são geralmente encontradas em maior prevalência nas mulheres do que nos homens. Entre estas, as translocações recíprocas são as mais observadas, acometendo diversos cromossomos. As robertsonianas são as segundas mais prevalentes, sendo principalmente observadas nos cromossomos 13, 14, 21 e 22, podendo ser também envolvido o cromossomo 15. Em menor prevalência pode-se observar as inversões e as deleções, sendo as duplicações e os marcadores vistos de forma mais esporádica (Goddijn et al., 2004; Stephenson et al., 2006; Dutta et al., 2010).

As translocações recíprocas são encontradas em cerca de 1,5 a 1,8 % dos pacientes que apresentam aborto recorrente ( Ogasawara et al., 2000; Goddijn et al., 2004; Stephenson et al., 2006). O prognóstico de gravidez em pacientes que apresentam translocações recíprocas é significativamente menor do que pacientes normais, sendo elas um forte fator de risco para o aborto recorrente ( Ogasawara et al., 2000).

As translocações cromossômicas equilibradas precisam de especial atenção pelo fato de geralmente, não apresentarem alteração no fenótipo do portador. Indivíduos portadores, durante a divisão meiótica, no processo de gametogênese, produzem gametas não equilibradas. Essas alterações estão relacionadas à consecutiva segregação e alinhamento anormal dos cromossomos, e pode levar a produção de gametas anormais e a um quadro de aborto recorrente e de infertilidade (Al-Ashi & Sharif, 2013; Cassuto et al., 2011).

A associação entre o aborto espontâneo e as translocações robertsonianas está ligada ao fato dos portadores possuírem um alto numero de gametas não equilibradas, resultando em gestações que dificilmente resistirão até o final do primeiro trimestre como nos casos dos cromossomo 14,15 e 22, e de gestações com

um grande risco de aborto espontâneo ou, ainda do nascimento de crianças com anomalias, como as dos cromossomos 13 e 21 (Munne et al., 2000; Kolgeci et al., 2012, 2013).

Alterações cromossômicas nos espermatozoides podem estar ligadas a má qualidade do mesmo. Alterações como dissomias, são encontradas de forma significativa em maiores quantidades em casais que apresentam aborto habitual, mostrando uma possível correlação entre o aborto e alterações cromossômicas espermáticas (Rubio et al., 1999).

#### **II.4.3 Alterações cromossômicas e a infertilidade**

As alterações cromossômicas estão entre as principais causas da infertilidade. Geralmente se expressam como uma malformação dos gametas devido a alterações espermáticas, ou falência ovariana prematura, como também abortos espontâneos (Toniolo & Rizzolio, 2007; Kosar et al., 2010).

As alterações cromossômicas detectadas em pacientes com aborto recorrente são também observadas em pacientes inférteis que não conseguem conceber. Essas alterações cromossômicas ocorrem em cerca de 3 % dos pacientes inférteis (Kayed et al., 2006). As alterações ligadas aos cromossomos sexuais são uma das principais causas associadas a infertilidade. Alterações estruturais de outros cromossomos também são relatadas (Kayed et al., 2006; Rajangan & Nanjappa, 2007).

Em mulheres inférteis, alterações numéricas como 45,X são frequentemente observadas. Conhecida como síndrome de Turner, algumas pacientes que deram início à sua vida reprodutiva e tentam o nascimento de um filho possuem essa alteração, geralmente apresentando-a com um fenótipo mais leve, e principalmente na forma de mosaicismo cromossômico. Ela se encontra muito associada a alterações que afetam a fertilidade da mulher, como exemplo a amenorreia primária (Rajangan & Nanjappa, 2007; Vijayalakshmi et al., 2010).

Outras alterações numéricas como a 47,XXX são observadas em mulheres inférteis. Associações entre falência ovariana prematura, malformações urogenitais e essa alteração são descritos na literatura (Otter et al., 2010).

Alterações numéricas nos homens, como a Síndrome de Klinefelter (47, XXY) são consideradas entre as principais causas cromossômicas de infertilidade. São as alterações cromossômicas de maior prevalência em pacientes com um quadro de infertilidade, e estão geralmente associadas a alterações no processo de espermatogênese, resultando em um quadro de azoospermia não obstrutiva ou oligospermia (Kayed et al., 2006; Martin, 2008; Kosar et al., 2010).

A síndrome do 47,XXY é outra alteração numérica que pode ocorrer em grupos de homens inférteis. Esses pacientes geralmente apresentam fertilidade normal, porém existe uma correlação entre esse cariótipo e alterações espermáticas (Martin, 2008).

As alterações estruturais em mulheres inférteis estão geralmente ligadas ao cromossomo X, em maior frequência do que com os autossomos. Observam-se translocações tanto equilibradas como não equilibradas do cromossomo, envolvendo as deleções e as duplicações dos ambos braços do cromossomo X (Talwar, 2014).

Dependendo da região translocada, as translocações equilibradas do cromossomo X com cromossomos autossomos, possuem uma grande correlação com a infertilidade. Translocações que envolvem o braço longo do cromossomo X estão ligadas a um quadro de falência ovariana prematura pelo fato de envolver genes ligados a funções ovarianas. Mulheres com essa alteração, ainda possuem uma grande possibilidade de ter descendentes tanto com a alteração equilibrada, como a não equilibrada (Bertini et al., 2010).

As deleções observadas tanto no braço curto, como no braço longo, são descritas em pacientes inférteis. A associação é encontrada pelo fato de que, dependendo da região deletada, pode haver uma associação com síndrome de Turner, e se as deleções atingirem regiões gênicas críticas da falência ovariana prematura, o portador apresenta um quadro característico da alteração (Tachdjian et al., 2008).

Entre as alterações cromossômicas estruturais observadas em homens inférteis, as deleções do cromossomo Y estão entre as mais frequentes (Kayed et al., 2006). Atingem uma região chamada de fator de azoospermia(AZF), e ela é dividida em três partes(AZF<sub>a</sub>, b e c). Essas regiões possuem genes responsáveis pelo processo de espermatogênese, e dependendo da região da deleção e dos genes atingidos, correlações com quadros de azoospermia e oligospermia são observados (Ferlin et al., 2005)

Outras alterações estruturais, além das observadas nos cromossomos sexuais, são comumente encontradas em casais inférteis. Translocações equilibradas, robertsonianas, inversões e deleções dos cromossomos autossomos são descritas (Kayed et al., 2006; Rajangan& Nanjappa, 2007).

As translocações recíprocas entre diversos cromossomos autossomos vêm sendo relatadas na literatura, como alterações que afetam a fertilidade. Translocações entre os cromossomos 1 e 11 correlacionam-se à disgenesia ovariana, e translocações entre os cromossomos 13 e 21 correlacionam-se a disfunções ovarianas, sugerindo a presença de genes autossomos ligados aos processos reprodutivos (Tullu et al., 2001; Kummer et al., 2009).

Entre todas as inversões encontradas em pacientes inférteis, as inversões pericêntricas do cromossomo 9 são as mais prevalentes (Kayed et al., 2006). A alteração afeta principalmente os homens no processo de espermatogênese, devido a perturbações no processo meiótico (Mozdarani et al., 2007).

Em relação à translocação Robertsoniana, observa-se maior incidência entre os cromossomos 13 e 14. O risco de não conseguir o nascimento de um filho, ou de ter um filho com malformações está ligado ao tipo de cromossomo envolvido (Kolgeci et al., 2012, 2013).

Segundo Frydman et al. (2001), o risco de um homem portador da translocação robertsoniana apresentar espermatozóides com alterações não equilibradas, é extremamente maior quando comparados com a população normal. Portanto é importante para pacientes portadores, submeterem-se ao diagnóstico pré-implantacional.

Indivíduos com a translocação homóloga 21q;21q e 15q;15q possuem um alto risco de aborto espontâneo. Os primeiros apresentam um risco de 100% de terem um aborto espontâneo ou um filho com síndrome de down e os segundos possuem um risco próximo de 100% de terem um aborto espontâneo (Kolgeci et al., 2012, 2013).

## Objetivos

---

### **III. Objetivos**

#### **Geral**

Verificar a importância das diferentes alterações cromossômicas na etiologia da infertilidade e discutir a indicação do cariótipo nos casos de dificuldades reprodutivas com vistas à prevenção de malformações congênitas.

#### **Específicos**

-Descrever as alterações cromossômicas observadas no sangue periférico de casais com problemas reprodutivos e comparar as frequências de anomalias numéricas e estruturais encontradas.

-Descrever as alterações cromossômicas observadas em vilosidades coriônicas, provenientes de abortos espontâneos e comparar as frequências de anomalias numéricas e estruturais encontradas.

-Verificar a presença de correlação estatística entre alterações cromossômicas em aborto espontâneo e idade materna.

-Verificar a presença de correlação estatística entre o sexo parental e alterações cromossômicas no sangue periférico.

-Verificar a presença de correlação estatística entre o número de abortos e alterações cromossômicas em aborto espontâneo e sangue periférico.

## Metodologia

---



## **IV. Metodologia**

### **IV.1 Casuística e Métodos**

O presente estudo foi desenvolvido no laboratório de genética do Departamento de Ciências Biológicas, faculdade de ciências, UNESP, Bauru, onde foram realizados os cariótipos de sangue periférico e material de abortos espontâneos. Alguns pacientes foram submetidos ao aconselhamento genético, conforme a solicitação e encaminhamento médico. Os atendimentos foram realizados no próprio laboratório que contava com um serviço anexo de genética clínica.

A casuística envolveu dados de 832 pacientes referentes a estudos cromossômicos (cariótipo) e anamnese, obtidos pela análise das fichas cadastrais e laudos dos cariótipos constantes nos prontuários arquivados no Laboratório. O período envolvido no levantamento dos dados foi de aproximadamente oito anos (Janeiro de 2005 a Dezembro de 2012).

Os critérios de inclusão das pessoas para esse trabalho foram: ter apresentado dificuldade em engravidar ou abortamentos espontâneos.

Coletaram-se de forma retrospectiva os dados de pacientes com problemas de fertilidade e posteriormente foi desenvolvida uma base de dados, contendo informações encontradas sobre a idade do paciente, o gênero, a história reprodutiva e os cariótipos de sangue e/ou de vilosidades coriônicas provenientes de abortos espontâneos.

Este trabalho foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa das Faculdades de Medicina de Botucatu e de Ciências de Bauru, UNESP.

### **IV.2 Métodos estatísticos**

Foram calculadas as frequências dos achados, e utilizados intervalos de 95% de confiança para a proporção de ocorrência. (Norman & Streiner 2008).

Utilizou-se para o estudo das correlações, o teste de associação de Goodman, complementado com as comparações de proporções entre e dentro de populações multinomiais (Goodman, 1964,1965), considerando o nível de 5% de significância. Adotou-se para a apresentação dos resultados, a convenção com letras minúsculas para comparação de grupos (linhas) fixada a categoria de resposta (coluna), e letras maiúsculas para comparação de categorias de resposta (colunas) dentro de grupo (linha).

#### **IV.3 Realização dos Cariótipos**

**Cariótipos de sangue periférico** – Para a obtenção dos cariótipos foi utilizada a técnica de análise cromossômica de bandamento GTG (Moorhead *et al.*, 1960):

Inicialmente ocorreu a coleta do material por punção venosa, com seringa heparinizada, e posteriormente foi implantado em meio de cultura (RPMI, soro fetal bovino e fitohemaglutinina) em uma estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C por 72 ou 96 horas para crescimento celular. Após esta etapa, a cultura foi interrompida injetando-se 0,05 mL da solução de Colchicina, por 45 minutos, para inibir o fuso mitótico e obter cromossomos metafásicos; centrifugou-se o material por cinco minutos, a 1750 rpm e retirou-se o sobrenadante. Para os processos de hipotonização da célula, utilizou-se 5ml da solução hipotônica KCl, por 30 minutos, para que as células ficassem túrgidas e os cromossomos se espalhassem. O processo foi finalizado pela fixação com ácido acético e álcool metílico, por três banhos sucessivos. O material final foi então gotejado na lâmina, em banho-maria, feito o bandamento desejado e corado com a solução de Giemsa.

**Cariótipos de vilosidades coriônicas dos abortos espontâneos** - Para a obtenção dos cariótipos foi utilizado a técnica de maceração mecânica e bandamento GTG, posteriormente (Heaton *et al.*, 1984):

Foram coletados nos centros cirúrgicos dos hospitais da região de Bauru através de curetagem uterina, os produtos de abortamentos espontâneos. Estes foram colocados para o transporte até o laboratório (ALAGe), em frascos estéreis, com o meio de cultura (Meio 199), e foi aplicada a técnica de maceração, de onde se separaram e maceraram as vilosidades coriônicas. Posteriormente utilizou-se a técnica de cultura em substrato, onde os materiais macerados foram misturados a uma solução de soro fetal bovino e amniomax basal, colocados em placas de Petri contendo uma lamínula, e incubados em uma estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após 48 horas, quando as células se fixaram à lamínula, adicionaram-se 5 ml de amniomax, mantendo-as em cultivo na estufa por 12 a 15 dias, de acordo o crescimento celular que foi observado. Após esse período a cultura foi interrompida com 0,05mL de Colchicina, por 45 minutos, e hipotonizada pela solução KCL, por 30 minutos. Finalizou-se pela fixação com ácido acético e álcool metílico, sucessivas lavagens e o bandamento para análise das metáfases.

Os bandamentos utilizados foram o G,C e NOR, sendo o G o principal utilizado e os outros só em casos específicos de confirmação. Para o bandamento G as lâminas foram tratadas com o agente proteolítico (tripsina), para obtenção dos padrões de bandas G claras e escuras. O C foi utilizado, após o G, para confirmação de alterações nas regiões de heterocromatina, utilizando a solução de hidróxido de bário. O bandamento NOR consistiu para confirmação de regiões satélites dos cromossomos, utilizando a solução de nitrato de prata. Em alguns casos o bandamento G de alta resolução foi utilizado, obtendo os cromossomos em prometáfase, observando um numero superior de bandas.

O processo de análise foi realizado no microscópio convencional, sendo desenhados e analisados 15 metáfases por paciente, ou analisados até 100 se este apresentou mosaicismo em alguma alteração. Os processos de análise e identificação seguiram as recomendações da International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN), o sistema de nomenclatura padrão utilizado para descrição das alterações cromossômicas.

## **Resultados e Discussão**

---

## **V. Resultados e Discussão**

Dos 832 pacientes, 619 eram do sexo feminino e 213 do sexo masculino. Alguns foram avaliados somente pelo cariótipo de sangue, porém outros avaliados pelos cariótipos de sangue e/ou de abortos espontâneos. Do total, 431 foram avaliados pelo cariótipo de sangue periférico e 401 pelos de abortos espontâneos. Dos 431 casos, 113 possuíam os cariótipos de abortos espontâneos analisados, totalizando 514 casos estudados pelos cariótipos de abortos espontâneos.

Entre os 514 casos estudados pelos cariótipos de abortos, alguns apresentaram mais de um aborto espontâneo, totalizando 556 abortos analisados. Entre esses, 187 não apresentaram resultados (devido ao não crescimento da cultura celular) e 369 apresentaram resultados citogenéticos, sendo estes incluídos no estudo.

As frequências absolutas dos diferentes cariótipos de sangue e de abortos espontâneos encontrados na casuística estão descritas na tabela 1. As alterações encontradas foram divididas em cinco grupos: normais (cariótipo 46, XY e 46, XX); polimorfismos; alterações numéricas; alterações estruturais; e presença de sítios frágeis.

Tabela 1: Cariótipos de sangue e de abortos espontâneos (continua)

Cariótipos de sangue	Frequência Absoluta	Cariótipos de Aborto	Frequência Absoluta
<b>Normal</b>		<b>Normal</b>	
46,XX	187	46,XX	214
46,XY	191	46,XY	33
<b>Polimorfismo</b>		<b>Polimorfismo</b>	
46,XX,9qh+	7	46,XX,inv9qh	2
46,XX,inv9qh	10	<b>Alterações Numéricas</b>	
46,XYqh+, inv 9qh	2	46,XY/47,XXY	3
46,XYqh+	3	46,XX/45,X	10
46,XY,15qh+	1	45,X	15
46,XYqh-	3	46,XX/47,XX+9	1
46,XY, 9qh-	1	46,XX/47,XX+D	1
<b>Alterações Numéricas</b>		69,XXY	5
47,XXY	4	46,XX/92,XXXX	5
46,X,i(Xq)/45,X	1	47,XX+14	1
46,XX/45,X	5	47,XX+21	11
46,XX,9qh+/45,x9qh+	1	47,XY+21	3
46,XX/47,XXX	3	69,XXX	8
46,XY/47,XXY	1	46,XY/47,XY+20	1
<b>Alterações Estruturais</b>		47,XX+16	6
46,XY t(1,3) (q32, p13)	1	47,XY+16	3
45,XY,qh-,der(13;14) (q10;q10)	1	70,XXY+16	1
45,XX,der(13;14)(q10;q10)	2	46,XX/69,XXX	5
45,XX,der(14;21)(q10;q10)	1	46,XX/69,XXY	2
46,X, del(X)(q21)	1	46,XX/47,XX+13	1
46,X,del(X)(q26;q28)	1	47,XX+17	2
46,XX/46,X,i(Xq)	1	46,XY/45,XY-8	1
46,XX/46,XX+mar	1	46,XX/47,XX+2	1
<b>Outros (Sítios frágeis)</b>		46,XX/47,XX+3	1
46,XX fra(16)(q23)	1	47,XX+18	1
46,XX fra(17)(p12)	1	47,XY+14	2
		46,XX/45,XX(-3)	2
		47,XY+19	1
		44,XX(-3,-21)/46,XX(-21, +14)	1
		46,XX/45,X(-19)	1
		47,XY+13	1
		46,XY/47,XY+21	2
		46,XX/47,XX+17	1
		44,X(-X;-13)7%/45,X3%	1
		47,XX+19	1
		46,XX/47,XX+21	5

Tabela 1: Cariótipos de sangue e de abortos espontâneos (conclusão)

Cariótipos de sangue	Frequência Absoluta	Cariótipos de Aborto	Frequência Absoluta
		46,XX/47,XX+16	1
		47,XY+7	1
		46,XY/47,XY+2	1
		46,XX/45,XX(-21)	1
		47,XY+21(der 14;21)	1
		47,XY+9	1
		47,XY+4	1
		47,XY+22	1
		<b>Alterações Estruturais</b>	
		45,XX,rob(13;14)(q10;q10)	1
		46,XX/46,XX(rob22;22)/44,xx(-22/-22)	1
		46,XX del 7	1
		46,XX/46,XX,del(5)(p12)+mar	1
		46,XX/46,XX,del(17)(p12)	1
		46,XX/46,X,i(Xp)	1

A frequência das idades dos pacientes está expressa no gráfico 1. Este permite-nos observar, de acordo com a faixa etária, a ocorrência de pacientes com problemas reprodutivos.

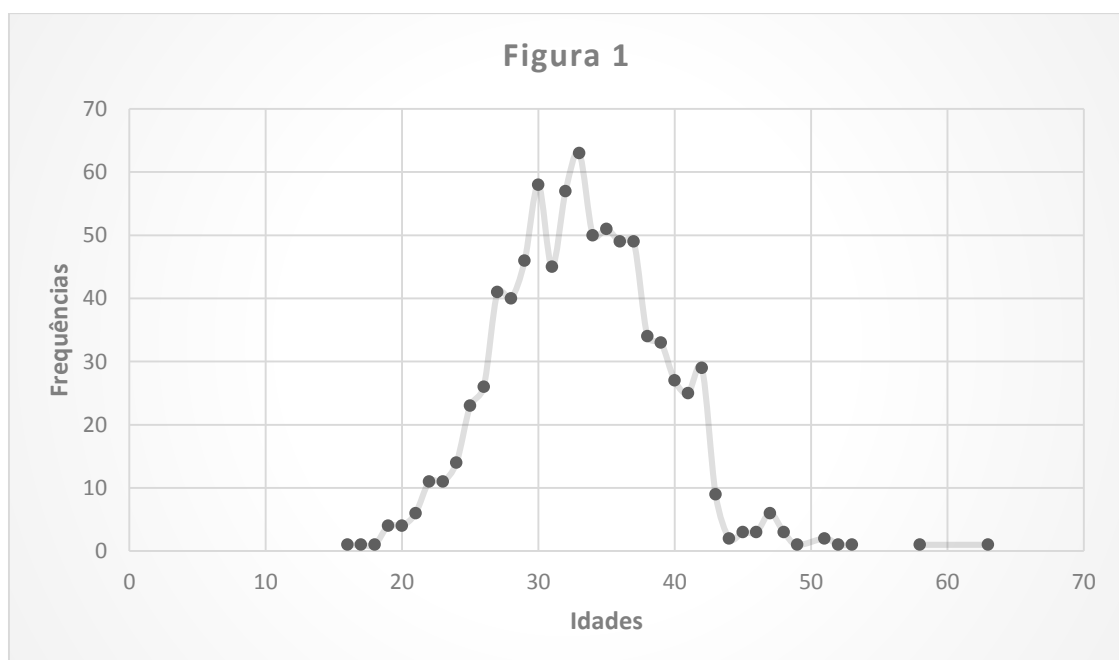


Gráfico 1: Frequências das idades dos pacientes

Observa-se um aumento na frequência a partir dos 22 anos de idade, elevando-se consideravelmente dos 27 aos 37 anos, tendo seu pico aos 33 anos. Esse achado se explica pela maior reprodução na faixa etária em questão.

As frequências dos resultados encontrados nos cariótipos de sangue periférico estão presentes na tabela 2.

Tabela 2: Distribuição de frequência dos cariótipos de sangue

<b>Cariótipo</b>	<b>Frequência Absoluta</b>	<b>Frequência Relativa (%)</b>
Normal	378	87,7
Polimorfismo	27	6,26
Alterações Numéricas	15	3,48
Alterações Estruturais	9	2,09
Outros(Sítios frágeis)	2	0,46
Total	431	100,00

Sabe-se que as alterações cromossômicas são causas frequentes dos insucessos reprodutivos. Na casuística, as variações cromossômicas no sangue periférico foram observadas em 12,3 % dos pacientes, sendo que as alterações que são consideradas fora da normalidade (Alterações numéricas e estruturais) estão presentes em aproximadamente 5,6 % dos casos. Essa prevalência foi similar ao estudo de Campanhol et al. (2011), onde os variantes polimórficos os mais frequentes e entre as outras alterações, as numéricas em maior ocorrência.

Outros estudos mostram prevalências de alterações cromossômicas em faixas similares a este estudo. Em uma revisão efetuada por Kiss et al. (2009), foi observado a ocorrência das alterações cromossômicas em pacientes que apresentam abortos recorrentes de 4,8% a 10,8%. Kayed et al. (2006) observaram uma



prevalência de alterações cromossômicas em cerca de 3% dos casais que apresentavam dificuldades em conceber.

Observa-se através da tabela 1 que as principais alterações numéricas são aquelas ligadas aos cromossomos sexuais. Estes possuem regiões essenciais ao funcionamento reprodutivo. Entre os mais frequentes estão os mosaicismos de 45,X (Síndrome de Turner), os relacionados a Síndrome de Klinefelter e à Síndrome do triplo X.

Em relação às alterações relacionadas a Síndrome de Turner, todos os portadores a apresentaram na forma de mosaicismo. Essa ocorrência se dá pelo fato dos pacientes com o quadro de mosaicismo apresentarem o fenótipo mais leve e, em certos casos, não apresentam características ligadas a síndrome, porém esses pacientes frequentemente apresentam problemas reprodutivos como amenorréia (Rajangan & Nanjappa, 2007) e abortos espontâneos, devido a alterações como anormalidades uterinas e função ovariana diminuída, sinais relacionados à Síndrome de Turner (Kuo & Guo, 2004). O mosaicismo da Síndrome do Triplo X, como encontrado em alguns pacientes, também está relacionado a problemas reprodutivos causando anomalias da função ovariana. Essa alteração é descrita em vários estudos com pacientes envolvidos com problemas reprodutivos (Kuo & Guo, 2004; Otter et al., 2010).

Assim como em outros estudos, o presente trabalho mostra que uma das alterações numéricas mais frequentes em homens, com problemas reprodutivos, é a Síndrome de Klinefelter, que apesar da maioria dos portadores não apresentarem fenótipo típico da síndrome, apresentam alterações no processo de espermatogênese, resultando em um quadro de azoospermia não obstrutiva ou oligospermia (Kayed et al., 2006; Martin, 2008).

Entre as alterações estruturais encontradas, observa-se uma maior prevalência das translocações robertsonianas e as alterações ligadas ao cromossomo X. Entre as robertsonianas, destaca-se uma maior incidência entre os cromossomos 13 e 14; considerada a mais prevalente das robertsonianas, e está extremamente ligada a problemas reprodutivos, levando os portadores a não apresentarem

geralmente um fenótipo alterado, porém possuem habilidade reprodutiva reduzida, aborto habitual e nascimentos malformados (Kolgeci et al., 2013).

As deleções parciais do cromossomo X, observadas na casuística, eram relacionadas ao braço longo. Levam a um quadro de monossomia parcial do cromossomo X, resultando em problemas reprodutivos que dependem da região deletada. Quando são deletados genes ligados ao funcionamento reprodutivo, problemas como a falência ovariana prematura são observados na portadoras (Tachdjian et al., 2008; Quilter et al., 2010).

A incidência de cromossomos marcadores é relatada em vários trabalhos; estão associados a problemas de fertilidade como também podem ser encontrados em populações normais. A influência do cromossomo marcador depende se ele é formado por regiões de heterocromatina ou de eucromatina, aqueles formados por eucromatina podem influenciar características fenotípicas (Kayed et al., 2006).

Os polimorfismos cromossômicos são alterações nas regiões de heterocromatina constitutiva, localizada em algumas partes do cromossomo, consideradas alterações normais. Apresentam uma ocorrência elevada em relação às outras variações, assim como relatado em outros trabalhos com pacientes com problemas reprodutivos; porém a sua ocorrência pode ser ainda maior pelo fato de ser uma variação muitas vezes não relatada, devido à falta de normatização do procedimento. Apesar de ser considerada uma variação dentro da normalidade, devido à sua grande ocorrência, autores recomendam que pesquisas moleculares possam indicar associações do polimorfismo com ganhos ou perdas genômicas (Campanhol et al., 2011).

As frequências dos resultados encontrados nos cariótipos dos abortos espontâneos da casuística estão presentes na tabela 3. Entre os abortos espontâneos analisados, 32,5 % apresentaram alterações cromossômicas, sendo 95 % destas, alterações numéricas e 5%, estruturais. Estudos como os de Eiben et al. (1990) e de Moraes et al. (2005), mostram uma prevalência de cerca de 50% das alterações cromossômicas nos abortos espontâneos, consideravelmente maior que a ocorrência neste estudo, porém similar ao estudo de Carp et al. (2001) onde encontraram uma

frequência de 29% de alterações cromossômicas. Por outro lado a prevalência de 95% de alterações numéricas em relação a 5% das estruturais corrobora com os encontrados nestes estudos, geralmente ligado ao fato de as alterações estruturais serem mais compatíveis com a vida.

Tabela 3 : Distribuição de frequência dos cariótipos de aborto

Cariótipo	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)	Intervalo de confiança	
			LI	LS
Normal	247	66,94	62,14	71,74
Polimorfismo	2	0,54	0,00	1,09
Alterações Numéricas	114	30,89	26,18	35,60
Alterações Estruturais	6	1,63	0,34	2,92
<b>Total</b>	369	100,00		

LI: limite inferior; LS: limite superior

A incidência menor de alterações cromossômicas encontradas nos abortos do presente trabalho em relação a outros, pode ser devido à contaminação das amostras pelo material materno, que tem maior crescimento celular. Além disso, 187 dos abortos estudados apresentaram contaminação por microorganismos e não houve crescimento da cultura. Esses fatores podem ter contribuído para a maior ocorrência de cariótipos normais, superestimando o valor real. No presente trabalho, pode-se também associar a contaminação materna com a discrepância encontrada na ocorrência de cariótipos do sexo feminino e masculino nos abortos, onde houve um número extremamente maior de cariótipos normais femininos (86,6%). A utilização da técnica citogenética direta poderia auxiliar na diminuição da contaminação pelo material materno (Eiben et al., 1990), e a utilização de técnicas moleculares como o PCR e FISH auxiliariam na identificação do sexo do aborto e no estudo cromossômico (Moraes et al., 2005), apesar das últimas terem custos elevados e o FISH não identificar alterações estruturais.

Conforme mostrou a tabela 1, entre as alterações cromossômicas encontradas nos abortos, as trissomias são as mais prevalentes, representando cerca

da metade de todas as alterações encontradas. Estudos como os de Eiben et al. (1990) e Nagaishi et al. (2004) mostram também a alta prevalência de trissomias, porém, nestes estudos, a trissomia mais prevalente é a do cromossomo 16, enquanto no presente estudo, a prevalência maior foi do cromossomo 21, seguido do cromossomo 16.

As monossomias são, após as trissomias, as alterações cromossômicas mais prevalentes (tabela1). Entre elas, a mais comum, é a monossomia do cromossomo X. Em seguida encontram-se as triploidias e tetraploidias. Esses resultados estão de acordo com Shearer et al. (2011).

A trissomia do 21, apesar de ser uma das cromossomopatias mais compatíveis com a vida, é uma das mais frequentes em abortos. Segundo (Morris et al., 1999) ocorre em 31% das perdas de primeiro trimestre. A trissomia do cromossomo 16 é uma das mais prevalentes em material de aborto. Quando ocorre na forma de mosaicismo a gestação pode avançar mais (Neiswanger, 2006).

Embora as monossomias sejam menos prevalentes que as trissomias, em material de aborto, a síndrome de Turner é a alteração mais frequente. Shearer et al. (2011) mostram também, uma prevalência maior da síndrome de Turner (tanto completa, como mosaico) em relação às outras alterações encontradas em abortos. A sua presença, como uma etiologia do aborto espontâneo, está ligada ao alto índice de mortalidade fetal durante o primeiro trimestre de gestação (Monney et al., 2000).

Outras alterações frequentes encontradas nos abortos, encontram-se as poliploidias. Entre elas, as triploidias são as mais frequentes (69,XXX e 69,XXY); estas, estão ligadas à etiologia do aborto espontâneo por estarem geralmente associadas a distúrbios na gravidez como a mola hidatiforme parcial. Grande parte das gestações molares não atingem o terceiro trimestre de gestação. É uma alteração resultante de dispermia ( fertilização do óvulo por dois espermatozóides) ou de erros na meiose (Zaragoza et al., 2000;). As tetraploidias, assim como as triploidias, relacionam-se com o aborto espontâneo, causando também mola hidatiforme parcial. Sua origem está ligada a fecundação de gametas diplóides, entre outras (Nakamura et al., 2003;). Segundo Carp et al. (2001) a apresentação de abortos com poliploidias pode ser pior no sentido que os pacientes com abortos poliploides possuem uma

menor taxa de nascimentos subsequente (41%) em relação a aqueles que apresentam abortos com aneuploidias (68%).

Em relação às alterações cromossômicas estruturais descritas nos abortos, as equilibradas podem ter surgidas de forma esporádica ou herdadas, sem relação com a perda gestacional, enquanto as não equilibradas, pelo fato de causarem quadros de monossomia ou trissomia parcial dos cromossomos como no caso do autossomo del(5)(p12)+mar, e estas, estarem ligadas a sintomas como retardo no desenvolvimento e mental (Ohashi, 2010).

Entre os 113 indivíduos cujos cariótipos de sangue e aborto foram analisados, observou-se a ocorrência, em alguns casos, de alterações cromossômicas no sangue e no aborto. Pode-se observar, por exemplo, ocorrência do polimorfismo inversão 9qh no sangue e 47,XXY no aborto; polimorfismo 9qh+ no sangue e trissomia do 21 (livre e mosaicismo) e triploidia nos abortos; translocações robertsonianas 13;14 e 14;21 no sangue e trissomia do 18 e do 21 (der 14;21), respectivamente, nos abortos. Observou-se também, alguns casos de monossomia do X, mosaico, no sangue e monossomia do X (em todas as células) no aborto; além de mosaicismo do triplo X no sangue e mosaicismo da monossomia do X no aborto. Esses achados podem sugerir que um cariótipo alterado nos pais, pode levar a alteração cromossômicas diferentes ou similares nos conceptos.

O estudo das correlações entre o sexo dos pacientes da casuística e a ocorrência das alterações cromossômicas nos cariótipos de sangue periférico, está presente na tabela 4.

Tabela 4: Distribuição dos cariótipos de sangue segundo o sexo

Sexo	Cariótipo de sangue					Total
	Normal	Polimorfismos	Alterações Numéricas	Alterações Estruturais	Outros (Sítios frágeis)	
Feminino	187 (85,8%)aC	13 (6,0%)aB	10 (4,6%)aAB	6 (2,7%)aAB	2 (0,9%)aA	218
Masculino	191 (89,7%)aC	14 (6,6%)aB	5 (2,3%)aA	3 (1,4%)aA	0 (0,0%)aA	213

Letras minúsculas para comparação de grupos (linhas) fixada a categoria de resposta (coluna). Letras maiúsculas para comparação de categorias de resposta (colunas) dentro de grupo (linha)

Observa-se que quando se compara os sexos, na ocorrência das alterações cromossômicas, não há uma diferença significativa entre eles. Embora o sexo feminino tenha apresentado um número maior de alterações numéricas, estruturais e de sítios frágeis, sendo os valores observados em quase o dobro, em relação ao sexo masculino.

A tabela 4 mostra ainda que, dentro de cada sexo, há diferenças significativas entre os diferentes tipos de variações cromossômicas existentes. No sexo feminino, a ocorrência dos cariótipos normais é significativamente maior que as outras variações cromossômicas, e que os polimorfismos são somente significativamente maiores que o grupo dos sítios frágeis; já no sexo masculino, também a ocorrência dos cariótipos normais é significativamente maior que as outras variações, porém os polimorfismos, diferentemente do sexo feminino, são significativamente maiores que as outras alterações.

O estudo das correlações entre as alterações cromossômicas nos abortos espontâneos e a idade materna é mostrado na tabela 5. As quatro faixas etárias consideradas foram: 16 a 24 anos, onde existe uma menor prevalência de pacientes que já iniciaram a sua vida reprodutiva; 25 a 34 anos, maior prevalência de pacientes com vida reprodutiva iniciada; 35 a 40 anos, faixa onde inicia o aumento da probabilidade de ocorrência de problemas reprodutivos; e 41 anos ou mais, idades mais avançadas, de chances menores de reprodução.

Tabela 5: Distribuição dos cariótipos de aborto segundo faixa etária

Faixa Etária	Cariótipo de aborto				Total
	Normal	Polimorfismos	Alterações Numéricas	Alterações Estruturais	
16 a 24	19 (65,5%)aC	1 (3,4%)aA	9 (31,0%)aB	0 (0,0%)aA	29
25 a 34	131 (64,5%)aC	1 (0,5%)aA	68 (33,5%)aB	3 (1,5%)aA	203
35 a 40	76 (69,1%)aC	0 (0,0%)aA	31 (28,2%)aB	3 (2,7%)aA	110
41 ou mais	21 (77,8%)aC	0 (0,0%)aA	6 (22,2%)aB	0 (0,0%)aA	27

Letras minúsculas para comparação de grupos (linhas) fixada a categoria de resposta (coluna). Letras maiúsculas para comparação de categorias de resposta (colunas) dentro de grupo (linha)

Observa-se que não há significância da ocorrência das variações cromossômicas entre as diferentes faixas etárias. Quanto às variações cromossômicas dentro das faixas etárias, encontramos em todas as faixas, uma diferença significativa entre os cariótipos normais e as outras variações, e uma ocorrência significativamente maior das alterações numéricas em relação aos polimorfismos e às alterações estruturais. Essa diferença significativa das alterações numéricas em relação as outras alterações, como já referido antes, ocorre pelo fato de fazerem parte de 95% das alterações cromossômicas encontradas nos abortos (Eiben et al., 1990) e por serem menos compatíveis com a vida do que às outras alterações.

Estudos como os de Hassold & Chiu (1985), Eiben et al. (1990) e Marquard et al. (2010) mostram, em estudos similares onde a frequência das alterações cromossômicas não aumentam significativamente com a idade materna, que ao considerar de forma separada as trissomias, é possível se observar um aumento significativo com a elevação da faixa etária materna. Dessa forma podemos concluir que embora, como um todo, as alterações cromossômicas em conceptos não se elevam com a idade materna, exceção deve ser feita às trissomias.

O estudo das correlações entre as alterações cromossômicas nos abortos espontâneos e número de abortos anteriores estão representadas na tabela 6. Para o estudo dessas correlações, incluíram-se somente pacientes que possuíam dados nos prontuários relativos ao número de abortos, obtidos quando realizaram o aconselhamento genético, totalizando 88 pacientes.

Tabela 6: Distribuição do cariótipo de aborto e o número de abortos

Número de Abortos	Cariótipo de aborto				Total
	Normal	Polimorfismos	Alterações Numéricas	Alterações Estruturais	
1 a 2	22 (30,6%)aB	2 (2,8%)aA	44 (61,1%)aC	4 (5,6%)aA	72
3 ou mais	10 (62,5%)aB	0 (0,0%)aA	5 (31,3%)aB	1 (6,3%)aA	16

Letras minúsculas para comparação de grupos (linhas) fixada a categoria de resposta (coluna). Letras maiúsculas para comparação de categorias de resposta (colunas) dentro de grupo (linha)

Observa-se que não existe diferença significativa entre a ocorrência das alterações cromossômicas e número de abortos, apesar do número de alterações numéricas serem extremamente maiores na faixa de 1 a 2 abortos em relação a de 3 ou mais abortos. O número pequeno de pacientes que compõem a faixa de 3 ou mais abortos pode não ter auxiliado na avaliação da correlação. Dentro das faixas, observa-se, na de 1 a 2 abortos, uma ocorrência significativamente maior de cariótipos normais em relação às outras variações, e uma ocorrência significativamente maior das alterações numéricas em relação às estruturais e aos polimorfismos. Na faixa de 3 ou mais abortos, não se observa, nenhuma diferença significativa entre os cariótipos normais e alterações cromossômicas numéricas.

Quando avaliadas mulheres com idade acima dos 35 anos, Marquad et al. (2010) observou que a incidência de alterações cromossômicas era maior naquelas com maior número de abortos do que com abortos mais esporádicos, possivelmente pela grande incidência das trissomias. Por outro lado, Ogasawara et al. (2000) observou que os abortos com cariótipos normais são mais frequentes quando o aborto é habitual; o presente estudo corrobora esses resultados. O aumento do número de abortos com cariótipos normais, se deve possivelmente, à relação com outros fatores etiológicos que não, o cromossômico. Dessa forma, o cariótipo normal em abortos prévios é preditor de abortos subsequentes (Ogasawara, et al., 2000).

O estudo das correlações entre as alterações cromossômicas no sangue periférico e o número de abortos anteriores está apresentado na tabela 7. Para o estudo dessas correlações, incluíram-se somente pacientes que possuíam dados nos prontuários relativos ao número de abortos, obtidos quando realizaram o aconselhamento genético, totalizando 308 pacientes.

Tabela 7: Distribuição dos cariótipos de sangue e o número de abortos

Número de Abortos	Cariótipo de sangue					Total
	Normal	Polimorfismos	Alterações Numéricas	Alterações Estruturais	Outros (Sítios frágeis)	
0	43 (84,3%)aB	4 (7,8%)aA	2 (3,9%)aA	1 (2,0%)aA	1 (2,0%)aA	51
1 a 2	199 (90,0%)aC	14 (6,3%)aB	5 (2,3%)aA	3 (1,4%)aA	0 (0,0%)aA	221
3 ou mais	31 (86,1%)aB	1 (2,8%)aA	2 (5,5%)aA	1 (2,8%)aA	1 (2,8%)aA	36

Letras minúsculas para comparação de grupos (linhas) fixada a categoria de resposta (coluna). Letras maiúsculas para comparação de categorias de resposta (colunas) dentro de grupo (linha)



A tabela nos mostra que estatisticamente não há diferença das ocorrências das alterações cromossômicas no sangue e no número de abortos. Observa-se que as variações cromossômicas foram maiores na faixa de 0 abortos, tendo a faixa de 3 ou mais, um maior número de alterações numéricas e estruturais; a faixa de 1 a 2 abortos foi a que mais se apresentou dentro da normalidade, porém todas essas diferenças não estatisticamente significativas.

Dentro das três faixas observa-se que o número de cariótipos normais é significativamente maior que os das outras variações e na faixa de 1 a 2 abortos, a ocorrência de polimorfismos é significativamente maior que as outras alterações.

Estudos como de Campanhol et al. (2011) e Carp et al. (2004) mostraram também que não existe significância de ocorrência de alterações cromossômicas em sangue periférico dos casais, em relação ao número de abortos. O estudo de Carp et al. (2004) relatou uma frequência maior de alterações naqueles casais com três abortos, porém não significante, assim como no presente estudo. Entende-se que apesar de não existir uma diferença significativa, não se pode dizer que aqueles que possuem abortos possuem as mesmas ocorrências de alterações cromossômicas daqueles que nunca tiveram, pois, a faixa representada por 0 abortos é constituída por pacientes relacionados a problemas reprodutivos, e para uma conclusão deste tipo seria necessário um estudo com um grupo controle não relacionado a problemas reprodutivos.

## Conclusões

---

## VI. Conclusões

Na população aqui avaliada, as alterações cromossômicas, fizeram parte da etiologia dos problemas reprodutivos. Elas são encontradas no sangue periférico de parte dos pacientes, não havendo diferença estatística entre as alterações estruturais e as numéricas. Foram observadas, principalmente, alterações cromossômicas ligadas aos cromossomos sexuais. Essas foram responsáveis por cerca de um terço dos abortos espontâneos, valor este que poderia ter sido maior, se não houvesse contaminação pelo material materno, que também pode ter superestimado a frequência de cariótipos normais. As alterações numéricas nos abortos, foram significativamente mais frequentes.

Não se observou correlação estatística entre as alterações cromossômicas no sangue periférico e o sexo, mesmo tendo as mulheres um número maior de alterações, reforçando a necessidade de avaliação cromossômica em ambos os sexos. Não houve correlação estatística entre as alterações cromossômicas nos abortos e a idade materna, porém como alguns autores citam, deve-se considerar que a ocorrência das trissomias aumenta com a idade materna, sendo recomendado orientação pelo aconselhamento genético para mulheres com idade acima dos 35 anos que desejam se reproduzir. Também não se observou correlação estatística entre as alterações cromossômicas no sangue periférico, nos abortos e o número de abortos.

A ocorrência das alterações cromossômicas relacionadas a problemas reprodutivos, em uma população, reforça a grande participação destas na etiologia da infertilidade. Portanto, o diagnóstico dessas alterações é essencial para descartar e definir se a etiologia é cromossômica ou outras causas devem ser investigadas. Conclui-se que o cariótipo deve ser um procedimento de indicação essencial para todos os casais que tenham dificuldades reprodutivas, uma vez que as alterações cromossômicas levam à formação de conceitos anormais que podem ser abortados ou nascerem malformados. Para prevenção rigorosa da malformação congênita, pode-se investigar o cariótipo do casal durante os exames pré-concepcionais. Caso se detecte alguma alteração estrutural ou numérica, se sugere o encaminhado para o aconselhamento genético que orientará sobre métodos de reprodução assistida, diagnóstico pré-implantacional ou, ainda, investigação de diagnóstico pré-natal. A

primeira indicação, embora mais complexa e exigente de mais recursos e pessoal treinado, tem a grande vantagem de selecionar os embriões e implantá-los, sem a difícil decisão de interromper uma gestação de conceito malformado.

## Referências

---

## VII. Referências

- Aittomäki, K., Dieguez Lucena, J., Pakarinen, P., Sistonen, P., Tapanainen, J., Gromoll, J., ... & de la Chapelle, A. (1995). Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell*, 82(6), 959-968.
- Akinloye, Oluyemi, et al. "Cadmium toxicity: a possible cause of male infertility in Nigeria." *Reprod Biol* 6.1 (2006): 17-30.
- Al-Ashi, Shadi F., and Fadel A. Sharif. "Familial reciprocal translocation t (8; 17)(p23; q21) in a woman with recurrent spontaneous abortion." *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology* 2.4 (2013): 695-697.
- Anderson, Kirsty, Vicki Nisenblatt, and Rob Norman. "Lifestyle factors in people seeking infertility treatment—a review." *Australian and New Zealand journal of obstetrics and gynaecology* 50.1 (2010): 8-20.
- Azziz, R., et al. "Androgen Excess Society. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline." *J Clin Endocrinol Metab* 91.11 (2006): 4237-4245.
- Bellver, José, et al. "Obesity and the risk of spontaneous abortion after oocyte donation." *Fertility and sterility* 79.5 (2003): 1136-1140.
- Bertini, V., Ghirri, P., Bicocchi, M. P., Simi, P., & Valetto, A. (2010). Molecular cytogenetic definition of a translocation t (X; 15) associated with premature ovarian failure. *Fertility and sterility*, 94(3), 1097-e5.
- Bezold, Guntram, et al. "Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia." *Fertility and sterility* 87.5 (2007): 1087-1097.
- Bohring, C., & Krause, W. (2003). Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto)-immunity The value of proteomic analysis. *Human reproduction*, 18(5), 915-924.

Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A., & Nygren, K. G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human reproduction*, 22(6), 1506-1512.

Caetano, Marcos Roberto, et al. "Gestational prognostic factors in women with recurrent spontaneous abortion." *Sao Paulo Medical Journal* 124.4 (2006): 181-185.

Campanho, C. D. L., Heinrich, J. K., Couto, E., & Barini, R. (2011). Fenótipo de subfertilidade, polimorfismos cromossômicos e falhas de concepção; Subfertility phenotype, chromosome polymorphism and conception failures. *Rev. bras. ginecol. obstet*, 33(5), 246-251.

Cardona, D. (2012). Estudo Epidemiológico da Infertilidade-Prevalência e Importância Médico-Legal.

Carp, Howard, et al. "Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage." *Fertility and sterility* 75.4 (2001): 678-682.

Carp, Howard, et al. "Parental karyotype and subsequent live births in recurrent miscarriage." *Fertility and sterility* 81.5 (2004): 1296-1301.

Cassuto, Nino Guy, et al. "Sperm fluorescence in situ hybridization study in nine men carrying a Robertsonian or a reciprocal translocation: relationship between segregation modes and high-magnification sperm morphology examination." *Fertility and sterility* 96.4 (2011): 826-832.

Cavalcante, Marcelo Borges, et al. "Interferência da idade sobre a qualidade seminal." *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 30.11 (2008): 561-565.

Celep, Figen, et al. "The frequency of chromosomal abnormalities in patients with reproductive failure." *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 127.1 (2006): 106-109.

Cetin, I., V. Cozzi, and P. Antonazzo. "Infertility as a cancer risk factor—a review." *Placenta* 29 (2008): 169-177.

CHANDLEY, A. C. (1979). The chromosomal basis of human infertility. *British Medical Bulletin*, 35(2), 181-186.

Chen, Ting-Hsiu, et al. "Prevalence of depressive and anxiety disorders in an assisted reproductive technique clinic." *Human reproduction* 19.10 (2004): 2313-2318.

Cheng, J. Y. W., and E. M. L. Ng. "Body mass index, physical activity and erectile dysfunction: an U-shaped relationship from population-based study." *International Journal of Obesity* 31.10 (2007): 1571-1578.

Cooper, Trevor G., et al. "World Health Organization reference values for human semen characteristics." *Human reproduction update* (2009): dmp048.

Cunningham, Kelly A., and Kenneth W. Beagley. "Male genital tract chlamydial infection: implications for pathology and infertility." *Biology of reproduction* 79.2 (2008): 180-189.

de Moraes, Andréa Cristina, et al. "Abordagem citogenética e molecular em material de abortos espontâneos." *Rev Bras Ginecol Obstet* 27.9 (2005): 554-60.

D'Hooghe, Thomas M., et al. "Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved?." *Seminars in reproductive medicine*. Vol. 21. No. 02. Copyright© 2003 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.: + 1 (212) 584-4662, 2003

Dohle, Gert R. "Male infertility in cancer patients: review of the literature." *International Journal of Urology* 17.4 (2010): 327-331.

Du Plessis, Stefan S., et al. "The effect of obesity on sperm disorders and male infertility." *Nature Reviews Urology* 7.3 (2010): 153-161.

Dunson, David B., Bernardo Colombo, and Donna D. Baird. "Changes with age in the level and duration of fertility in the menstrual cycle." *Human reproduction* 17.5 (2002): 1399-1403.

Dunson, David B., Donna D. Baird, and Bernardo Colombo. "Increased infertility with age in men and women." *Obstetrics & Gynecology* 103.1 (2004): 51-56.

Dutta, U. R., Rajitha, P., Pidugu, V. K., & Dalal, A. B. (2011). Cytogenetic abnormalities in 1162 couples with recurrent miscarriages in Southern region of India: report and review. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(2), 145-149.



Ehrmann, D. A. (2005). Polycystic ovary syndrome. *New England Journal of Medicine*, 352(12), 1223-1236.

Eiben, Bernd, et al. "Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage." *American journal of human genetics* 47.4 (1990): 656.

Fassino, S., et al. "Anxiety, depression and anger suppression in infertile couples: a controlled study." *Human Reproduction* 17.11 (2002): 2986-2994.

Ferlin, A., Tessari, A., Ganz, F., Marchina, E., Barlati, S., Garolla, A., ... & Foresta, C. (2005). Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *Journal of medical genetics*, 42(3), 209-213.

Forges, T., et al. "Autoimmunity and antigenic targets in ovarian pathology." *Human Reproduction Update* 10.2 (2004): 163-175.

Friebe, Astrid, and Petra Arck. "Causes for spontaneous abortion: What the bugs 'gut'to do with it?." *The international journal of biochemistry & cell biology* 40.11 (2008): 2348-2352.

Frydman, Nelly, et al. "Assisting reproduction of infertile men carrying a Robertsonian translocation." *Human Reproduction* 16.11 (2001): 2274-2277.

Gardner, RJ McKinlay, Grant R. Sutherland, and Lisa G. Shaffer. *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. New York: Oxford University Press, 2004.

Geidam, A. D., et al. "Hormonal profile of men investigated for infertility at the University of Maiduguri in northern Nigeria." *Singapore medical journal* 49.7 (2008): 538-541.

Goddijn, M., Joosten, J. H. K., Knegt, A. C., Franssen, M. T. M., Bonse, G. J., & Leschot, N. J. (2004). Clinical relevance of diagnosing structural chromosome abnormalities in couples with repeated miscarriage. *Human Reproduction*, 19(4), 1013-1017.

Goodman LA. On simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Ann Math Stat*. 1964; 35(2):716-25.

- Goodman LA. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics*. 1965; 7(2):247-54.
- Gorelick, J. I., & Goldstein, M. (1993). Loss of fertility in men with varicocele. *Fertility and sterility*, 59(3), 613-616.
- Gracia, Clarisa R., et al. "Occupational exposures and male infertility." *American journal of epidemiology* 162.8 (2005): 729-733.
- Greenstein, B., & Wood, D. (2011). *The endocrine system at a glance* (Vol. 42). John Wiley & Sons.
- Griebel, Craig P., et al. "Management of spontaneous abortion." *Am Fam Physician* 72.7 (2005): 1243-50.
- Gupta, Sajal, et al. "Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility." *Fertility and sterility* 90.2 (2008): 247-257.
- Gurunath, S., Pandian, Z., Anderson, R. A., & Bhattacharya, S. (2011). Defining infertility—a systematic review of prevalence studies. *Human reproduction update*, 17(5), 575-588.
- Guzick, David S., et al. "Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men." *New England Journal of Medicine* 345.19 (2001): 1388-1393.
- Haas, Dietmar, et al. "The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: their strengths and weaknesses." *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 92.1 (2013): 3-7.
- Habbema, J. D. F., Collins, J., Leridon, H., Evers, J. L., & Lunenfeld, B. (2004). Towards less confusing terminology in reproductive medicine: a proposal. *Human Reproduction*, 19(7), 1497-1501.
- Hadinedoushan, Hossein, and Mohammad Ghafourzadeh. "A survey of anti-sperm antibodies in infertile couples." *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 5.1 (2007): 39-40.

Haggerty, Catherine L., et al. "Bacterial vaginosis and anaerobic bacteria are associated with endometritis." *Clinical Infectious Diseases* 39.7 (2004): 990-995.

Haggerty, Catherine L., et al. "Risk of sequelae after Chlamydia trachomatis genital infection in women." *Journal of Infectious Diseases* 201.Supplement 2 (2010): S134-S155.

Hamamah, S., A. Fignon, and J. Lansac. "The effect of male factors in repeated spontaneous abortion: lesson from in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection." *Human reproduction update* 3.4 (1997): 393-400.

Hamamah, S., A. Fignon, and J. Lansac. "The effect of male factors in repeated spontaneous abortion: lesson from in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection." *Human reproduction update* 3.4 (1997): 393-400.

Hammoud, Ahmad O., et al. "Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature." *Fertility and sterility* 90.4 (2008): 897-904.

Harrison, R. F., & Barry-Kinsella, C. (2000). Efficacy of medroxyprogesterone treatment in infertile women with endometriosis: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Fertility and sterility*, 74(1), 24-30.

Hassold, T., & Hunt, P. (2001). To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics*, 2(4), 280-291.

Hassold, T., and D. Chiu. "Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy." *Human genetics* 70.1 (1985): 11-17.

Heaton, D. E.; Czepulkowski, B. H.; Horwell, D. H.; Coleman, D. V. "Chromosome Analysis Of First Trimester Chorionic Villus Biopsies Prepared By A Maceration Technique." *Prenatal Diagnosis*. V. 4, P. 279-287, 1984.

Homburg, R. "Polycystic ovary syndrome—from gynaecological curiosity to multisystem endocrinopathy." *Human Reproduction* 11.1 (1996): 29-39.

Hughes, Edward, et al. "Ovulation suppression for endometriosis for women with subfertility." *The Cochrane Library* (2007).

Hull, M. G., Glazener, C. M., Kelly, N. J., Conway, D. I., Foster, P. A., Hinton, R. A., ... & Desai, K. M. (1985). Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *British medical journal (Clinical research ed.)*, 291(6510), 1693.

Imudia, Anthony N., et al. "The prevalence of ureaplasma urealyticum, mycoplasma hominis, chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae infections, and the rubella status of patients undergoing an initial infertility evaluation." *Journal of assisted reproduction and genetics* 25.1 (2008): 43-46.

Inoue, Masato, et al. "The impact of endometriosis on the reproductive outcome of infertile patients." *American journal of obstetrics and gynecology* 167.1 (1992): 278-282.

Irvine, D. S. (1998). Epidemiology and aetiology of male infertility. *Human Reproduction*, 13(suppl 1), 33-44.

Joki-Korpela, Päivi, et al. "The role of Chlamydia trachomatis infection in male infertility." *Fertility and sterility* 91.4 (2009): 1448-1450.

Kamienicznaabdef, Marzena, Alina Domagałabde, and Maciej Kurpiszacdeg. "The frequency of antisperm antibodies in infertile couples—a Polish pilot study." *Signature* 9.4 (2003): 201.

Kamischke, A., and E. Nieschlag. "Mini symposium: non-surgical sperm recovery: Part II. Treatment of retrograde ejaculation and anejaculation." *Human Reproduction Update* 5.5 (1999): 448-474.

Kayed, H. F., Mansour, R. T., Aboulghar, M. A., Serour, G. I., Amer, A. E., & Abdrazik, A. (2006). Screening for chromosomal abnormalities in 2650 infertile couples undergoing ICSI. *Reproductive biomedicine online*, 12(3), 359-370.

Kennedy, C., et al. "Sperm chromatin structure correlates with spontaneous abortion and multiple pregnancy rates in assisted reproduction." *Reproductive biomedicine online* 22.3 (2011): 272-276.

Kennedy, Stephen, et al. "ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis." *Human Reproduction* 20.10 (2005): 2698-2704.

Kiss, A., Rosa, R. F. M., Dibi, R. P., Zen, P. R. G., Pfeil, J. N., Graziadio, C., & Paskulin, G. A. (2009). Anormalidades cromossômicas em casais com história de aborto recorrente; Chromosomal abnormalities in couples with history of recurrent abortion. *Rev. bras. ginecol. obstet*, 31(2), 68-74

Kolgeci, S., Kolgeci, J., Azemi, M., Shala, R., Daka, A., & Sopjani, M. (2013). Reproductive risk of the silent carrier of Robertsonian translocation. *Med Arh*, 67(1), 56-59.

Kolgeci<sup>1</sup>, S., Azemi, M., Ahmeti, H., Dervishi, Z., Sopjani, M., & Kolgeci, J. (2012). Recurrent abortions and Down syndrome resulting from Robertsonian translocation 21q; 21q. *Med Arh*, 66(5), 350-352.

Koşar, P. A., Özçelik, N., & Koşar, A. (2010). Cytogenetic abnormalities detected in patients with non-obstructive azoospermia and severe oligozoospermia. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 27(1), 17-21.

Kummer, Nicole, J. Ryan Martin, and Lubna Pal. "Diminished ovarian reserve in a woman with a balanced 13; 21 translocation." *Fertility and sterility* 91.3 (2009): 931-e3.

Kuo, P. L., & Guo, H. R. (2004). Mechanism of recurrent spontaneous abortions in women with mosaicism of X-chromosome aneuploidies. *Fertility and sterility*, 82(6), 1594-1601.

Larsen, U. (2000). Primary and secondary infertility in sub-Saharan Africa. *International Journal of Epidemiology*, 29(2), 285-291.

Larsen, U. (2003). Infertility in central Africa. *Tropical Medicine & International Health*, 8(4), 354-367.

Larsen, U. (2005). Research on infertility: which definition should we use?. *Fertility and sterility*, 83(4), 846-852.

Lashen, H., K. Fear, and D. W. Sturdee. "Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage: matched case-control study." *Human Reproduction* 19.7 (2004): 1644-1646.

- Lee, H. D., Lee, H. S., Park, S. H., Jo, D. G., Choe, J. H., Lee, J. S., & Seo, J. T. (2012). Causes and classification of male infertility in Korea. *Clinical and experimental reproductive medicine*, 39(4), 172-175.
- Li, T. C., et al. "Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis." *Human reproduction update* 8.5 (2002): 463-481.
- Liu, J., Larsen, U., & Wyshak, G. (2005). Prevalence of primary infertility in China: in-depth analysis of infertility differentials in three minority province/autonomous regions. *Journal of biosocial science*, 37(01), 55-74.
- Ljunger, Elisabeth, et al. "Chromosomal anomalies in first-trimester miscarriages." *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 84.11 (2005): 1103-1107.
- Maconochie, N., et al. "Risk factors for first trimester miscarriage—results from a UK-population-based case–control study." *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 114.2 (2007): 170-186.
- Malik, Abida, et al. "< i> Chlamydia trachomatis</i> infection in women with secondary infertility." *Fertility and sterility* 91.1 (2009): 91-95.
- Marquard, Kerri, et al. "Etiology of recurrent pregnancy loss in women over the age of 35 years." *Fertility and sterility* 94.4 (2010): 1473-1477.
- Martin, R. H. (2008). Cytogenetic determinants of male fertility. *Human reproduction update*, 14(4), 379-390.
- Mascarenhas, M. N., Cheung, H., Mathers, C. D., & Stevens, G. A. (2012) B. Measuring infertility in populations: constructing a standard definition for use with demographic and reproductive health surveys. *Popul Health Metr*, 10(1), 17.
- Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. (2012) A. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS medicine*, 9(12), e1001356.
- Mendiola, Jaime, Alberto M. Torres-Cantero, and Ashok Agarwal. "Lifestyle factors and male infertility: an evidence-based review." *Arch Med Sci* 5.1A (2009): S3-12.

- Meuleman, Christel, et al. "High prevalence of endometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners." *Fertility and sterility* 92.1 (2009): 68-74.
- Mohan, K., & Sultana, M. (2010). Follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and prolactin levels in infertile women in north Chennai, Tamilnadu. *Journal of Biological science Research*, 1(4).
- Monney, C., G. Pescia, and M. C. Addor. "Le syndrome de Turner." *Schweiz Med Wochenschr* 130.38 (2000): 1339-43.
- Moon, Min Hoan, et al. "Scrotal US for Evaluation of Infertile Men with Azoospermia 1." *Radiology* 239.1 (2006): 168-173.
- Moorhead, P.S.; Nowell, P.C.; Mellman, W.J.; Battips, D.M.; Hungerford, D.A. "Chromosome Preparations Of Leukocytes Cultured From Human Peripheral Blood." *Exp. Cell Res.* V.20, P.613-16, 1960.
- Morris, J. K., N. J. Wald, and H. C. Watt. "Fetal loss in Down syndrome pregnancies." *Prenatal diagnosis* 19.2 (1999): 142-145.
- Mozdarani, H., Meybodi, A. M., & Karimi, H. (2007). Impact of pericentric inversion of Chromosome 9 [inv (9)(p11q12)] on infertility. *Indian journal of human genetics*, 13(1), 26.
- Munne, S., et al. "Gamete segregation in female carriers of Robertsonian translocations." *Cytogenetic and Genome Research* 90.3-4 (2000): 303-308.
- Nagaishi, M., Yamamoto, T., Iinuma, K., Shimomura, K., Berend, S. A., & Knops, J. (2004). Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 30(3), 237-241.
- Nakamura, Y., et al. "A tetraploid liveborn neonate: cytogenetic and autopsy findings." *Archives of pathology & laboratory medicine* 127.12 (2003): 1612.
- Navi, Khan Gul-Ar, D. K. Agarwal, and Rabbani Tamkeen. "ANTI SPERM ANTIBODY AS A CAUSE OF IMMUNOLOGICAL INFERTILITY IN MALES." *Journal of Advance Researches in Biological Sciences* 4.1 (2012): 1-4.

Ness, Roberta B., et al. "Infertility, fertility drugs, and ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies." *American journal of epidemiology* 155.3 (2002): 217-224.

NICE, Ÿ. (2004). Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems. *Clinical guidelines, CG11-Issued: February*.

Nigro, Giovanni, et al. "Role of the infections in recurrent spontaneous abortion." *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 24.8 (2011): 983-989.

NORMAN, G.R.; STREINER, D.L. Biostatistics: the bare essentials. 3 ed. St. Louis: Mosby Year Book, 2008. 393p.

Ochsendorf, F. R. "Sexually transmitted infections: impact on male fertility." *Andrologia* 40.2 (2008): 72-75.

Ogasawara, M., Aoki, K., Okada, S., & Suzumori, K. (2000). Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertility and sterility*, 73(2), 300-304.

Ohashi, Hiroyasu, et al. "Implications of prenatal diagnosis of the fetus with both interstitial deletion and a small marker ring originating from chromosome 5." *American Journal of Medical Genetics Part A* 155.1 (2011): 192-196.

Otter, M., Schrandt-Stumpel, C. T., & Curfs, L. M. (2009). Triple X syndrome: a review of the literature. *European Journal of Human Genetics*, 18(3), 265-271.

Pandey, Manoj Kumar, Reena Rani, and Suraksha Agrawal. "An update in recurrent spontaneous abortion." *Archives of gynecology and obstetrics* 272.2 (2005): 95-108.

Pasquali, Renato, et al. "Obesity and reproductive disorders in women." *Human reproduction update* 9.4 (2003): 359-372.

Passos, E. P., de Almeida, I. C. A., & Fagundes, P. A. P. (2007). *Quando a gravidez não acontece: perguntas e respostas sobre infertilidade conjugal*. Artmed.

Pellicer, Antonio, et al. "Endometrial quality in infertile women with endometriosis." *Annals of the New York Academy of Sciences* 943.1 (2001): 122-130.



Pérez, Juliano Adams, et al. "Prevalence of uterine and tubal abnormalities in infertile women: a study of 48 cases." *Radiologia Brasileira* 34.2 (2001): 79-81.

Perino, Antonio, et al. "Human papillomavirus infection in couples undergoing in vitro fertilization procedures: impact on reproductive outcomes." *Fertility and sterility* 95.5 (2011): 1845-1848.

PIERIK, FRANK H., et al. "Is routine scrotal ultrasound advantageous in infertile men?." *The Journal of urology* 162.5 (1999): 1618-1620.

Poppe, Kris, Brigitte Velkeniers, and Daniel Glinooer. "The role of thyroid autoimmunity in fertility and pregnancy." *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism* 4.7 (2008): 394-405.

Poppe, Kris, et al. "Thyroid dysfunction and autoimmunity in infertile women." *Thyroid* 12.11 (2002): 997-1001.

Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. (2013). Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertility and sterility*, 99(1), 63.

Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. "Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion." *Fertility and sterility* 98.2 (2012-b): 294.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2006). Aging and infertility in women. *Fertility and sterility*, 86(5 Suppl 1), S248.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. "Endometriosis and infertility: a committee opinion." *Fertility and sterility* 98.3 (2012-a): 591.

Quilter, C. R., et al. "Analysis of X chromosome genomic DNA sequence copy number variation associated with premature ovarian failure (POF)." *Human reproduction* 25.8 (2010): 2139-2150.

Rai, Raj, and Lesley Regan. "Recurrent miscarriage." *The Lancet* 368.9535 (2006): 601-611.

Rajangam, S., & Nanjappa, L. (2007). Cytogenetic studies in amenorrhea. *Saudi medical journal*, 28(2), 187-192.

Ralph, S. G., A. J. Rutherford, and J. D. Wilson. "Influence of bacterial vaginosis on conception and miscarriage in the first trimester: cohort study." *Bmj* 319.7204 (1999): 220-223.

Raman, Jay D., Craig F. Nobert, and Marc Goldstein. "Increased incidence of testicular cancer in men presenting with infertility and abnormal semen analysis." *The Journal of urology* 174.5 (2005): 1819-1822.

Regan, Lesley, Peter R. Braude, and Paula L. Trembath. "Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion." *BMJ: British Medical Journal* 299.6698 (1989): 541.

Ross, Amanda, et al. "HIV-1 disease progression and fertility: the incidence of recognized pregnancy and pregnancy outcome in Uganda." *Aids* 18.5 (2004): 799-804.

Rubio, C., Simón, C., Blanco, J., Vidal, F., Mínguez, Y., Egozcue, J., ... & Pellicer, A. (1999). Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 16(5), 253-258.

Shearer, B. M., Thorland, E. C., Carlson, A. W., Jalal, S. M., & Ketterling, R. P. (2011). Reflex fluorescent in situ hybridization testing for unsuccessful product of conception cultures: a retrospective analysis of 5555 samples attempted by conventional cytogenetics and fluorescent in situ hybridization. *Genetics in Medicine*, 13(6), 545-552.

Short, Vanessa L., et al. "Clinical presentation of Mycoplasma genitalium infection versus Neisseria gonorrhoeae infection among women with pelvic inflammatory disease." *Clinical Infectious Diseases* 48.1 (2009): 41-47.

Stephenson, Mary D., and Sony Sierra. "Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement." *Human Reproduction* 21.4 (2006): 1076-1082.

Tachdjian, Gérard, et al. "Cryptic Xp duplication including the SHOX gene in a woman with 46, X, del (X)(q21. 31) and premature ovarian failure." *Human reproduction* 23.1 (2008): 222-226.

Talwar, P. (2014). *Manual of Cytogenetics in Reproductive Biology*. JP Medical Ltd.

Thoma, Marie E., et al. "Prevalence of infertility in the United States as estimated by the current duration approach and a traditional constructed approach." *Fertility and sterility* 99.5 (2013): 1324-1331.

Thonneau, Patrick, et al. "Incidence and main causes of infertility in a resident population (1 850 000) of three French regions (1988–1989)\*." *Human Reproduction* 6.6 (1991): 811-816.

Toniolo, D., F. (2007, July). X chromosome and ovarian failure. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 25, No. 04, pp. 264-271). Copyright© 2007 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA..

Toth, Bettina, et al. "Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment." *Journal of reproductive immunology* 85.1 (2010): 25-32.

Tullu, M. S., et al. "Ovarian dysgenesis with balanced autosomal translocation." *Journal of postgraduate medicine* 47.2 (2001): 113.

Tur-Kaspa, Ilan, et al. "A prospective evaluation of uterine abnormalities by saline infusion sonohysterography in 1,009 women with infertility or abnormal uterine bleeding." *Fertility and sterility* 86.6 (2006): 1731-1735.

Unuane, D., Tournaye, H., Velkeniers, B., & Poppe, K. (2011). Endocrine disorders & female infertility. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(6), 861-873.

Vijayalakshmi, J., Koshy, T., Kaur, H., Mary, F. A., Selvi, R., Parvathi, V. D., ... & Paul, S. F. (2010). Cytogenetic analysis of patients with primary amenorrhea. *Int J Hum Genet*, 10(1-3), 71-76.

Wang, Jim X., Michael J. Davies, and Robert J. Norman. "Polycystic ovarian syndrome and the risk of spontaneous abortion following assisted reproductive technology treatment." *Human Reproduction* 16.12 (2001): 2606-2609.

Wang, Jim X., Robert J. Norman, and Allen J. Wilcox. "Incidence of spontaneous abortion among pregnancies produced by assisted reproductive technology." *Human Reproduction* 19.2 (2004): 272-277.

Wilcox, Allen J., et al. "Incidence of early loss of pregnancy." *New England Journal of Medicine* 319.4 (1988): 189-194.

Winston, L. R. (2013). *Infertility: a sympathetic approach to understanding the causes and options for treatment*. Random House.

winstostein, S. O., & Shah, I. H. (2004). Infecundity infertility and childlessness in developing countries.

Woodruff, Teresa K., and Karrie Ann Snyder, eds. *Oncofertility: fertility preservation for cancer survivors*. Vol. 138. Springer, 2007.

World Health Organization. "WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen." (2010).

World Health Organization. (1991). Infertility: a tabulation of available data on prevalence of primary and secondary infertility.

Zaragoza, Michael V., et al. "Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole." *The American Journal of Human Genetics* 66.6 (2000): 1807-1820.